

ANA ISABEL CAÑAS PORTILLA

**DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS LACASA-MEDIADOR:
EMPLEO DE MEDIADORES DE ORIGEN NATURAL Y
MEJORA DE LACASAS POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA**

Memoria para optar al grado de Doctora en Ciencias Ambientales por la
Universidad de Alcalá

DIRECTORES

Dra. Susana Camarero Fernández

Dr. Ángel T. Martínez Ferrer

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Microbiología y Parasitología

TUTORA: Dra. M^a Enriqueta Arias Fernández



Madrid, 2009



Susana Camarero Fernández, Dra. en Ciencias Biológicas, Científico Titular del CSIC y **Ángel T. Martínez Ferrer**, Dr. en Ciencias Biológicas, Profesor de Investigación del CSIC,

CERTIFICAN:

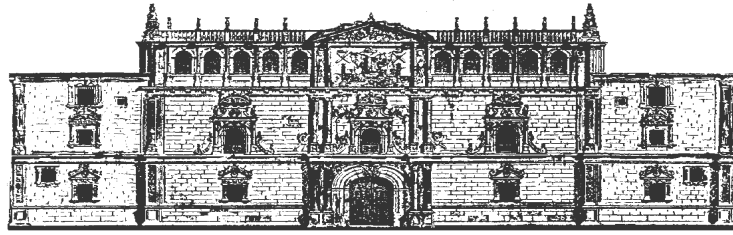
Que el presente trabajo, titulado *“Diseño de nuevos sistemas lacasa-mediador: empleo de mediadores de origen natural y mejora de lacasas por evolución dirigida”*, constituye la Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Ambientales Ana Isabel Cañas Portilla para optar al grado de Doctora y ha sido realizado, bajo su dirección, en el Departamento de Microbiología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas y en el Departamento de Biocatálisis del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Madrid, a 5 de mayo de 2009.

Susana Camarero Fernández

Ángel T. Martínez Ferrer

Universidad de Alcalá



Departamento de Microbiología y Parasitología

D. Juan Soliveri de Carranza, Profesor Titular de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que **D^a. Ana Isabel Cañas Portilla**, Licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad de Alcalá, ha realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas y en el Departamento de Biocatálisis del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC), bajo la dirección de los Doctores **D^a. Susana Camarero Fernández** y **D. Angel Tomás Martínez Ferrer**, el trabajo de investigación titulado: **“DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS LACASA-MEDIADOR: EMPLEO DE MEDIADORES DE ORIGEN NATURAL Y MEJORA DE LACASAS POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA”**, que presenta para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Alcalá de Henares a 25 de Marzo de 2009.

Fdo.: Juan Soliveri de Carranza

A mis padres

A Benja

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar”
Antonio Machado

Agradecimientos

El presente trabajo, realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas y en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, ambos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ha sido financiado por el proyecto “Caracterización de los sitios de unión a sustratos y otros aspectos de la arquitectura molecular de nuevas enzimas implicadas en la degradación de lignina y compuestos aromáticos” (Ref. BIO2002-01166), por una beca I3P del CSIC y por una beca FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación adscrita al proyecto “Diseño de nuevos sistemas lacasa-mediador capaces de degradar compuestos aromáticos de alto potencial redox” (Ref. CTQ2005-08925-C02-02).

No es fácil llegar al final, se necesita ahínco, lucha y deseo, pero sobre todo, la fuerza que me ha ayudado a conseguirlo ha sido el apoyo recibido de muchas personas. Para ellas van estas palabras de agradecimiento.

Gracias a la Dra. Susana Camarero Fernández, directora de esta tesis, por su enorme dedicación y esfuerzo, tanto, que podría decir que ha sido al mismo tiempo directora y coautora de esta tesis. Gracias también por la confianza depositada en mí, por su paciencia y apoyo en los momentos difíciles, y sobre todo, gracias por su amistad.

Al Dr. Ángel T. Martínez, director de esta tesis, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por sus aportaciones científicas y comentarios y por el tiempo extraído de sus obligaciones para corregir esta tesis.

A la Dra. M^a Jesús Martínez por sus consejos, orientación y ayuda. Por su amabilidad y cercanía.

A la Dra. M^a Enriqueta Arias Fernández, por aceptar amablemente ser tutora de esta tesis en la Universidad de Alcalá.

A los Dres. Antonio Ballesteros y Francisco Plou, por su excelente acogida en el grupo de Biocatálisis Aplicada. Quiero agradecer especialmente al Dr. Miguel Alcalde, por abrirme tan generosamente las puertas de su laboratorio y sumergirme en el maravilloso mundo de la evolución dirigida, poniendo a mi disposición todos sus conocimientos científicos de una forma tan cercana.

A la Dra. Rosa Sedano del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) (UAM) por los análisis cromatográficos.

A la Dra. Argelia Castaño, Jefa del Área de Toxicología Ambiental del Centro Nacional de Sanidad Ambiental (ISCIII), gracias por los ensayos de ecotoxicidad en algas y crustáceos de esta tesis.

Al Dr. Gumersindo Feijoo, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago, por los ensayos toxicológicos de Microtox®.

A mis compañeros del CIB, porque esta tesis también es vuestra. A Eva, por su ayuda en mis comienzos con la biología molecular y por los buenos momentos pasados, a Ángeles por su amistad y alegría andaluza, por escucharme y compartir “impresiones”, a Elvira por estar siempre dispuesta a ayudar con una dulce sonrisa, a Aitor por los ratos de risas y por su ayuda con los experimentos del final de la tesis, a Javi por sus valiosos protocolos y su amistad, a Bea por su fortaleza y ánimos, a M^a José por su simpatía. A los demás con los que he compartido buenos momentos: Victor, Davinia, Miguel, Yuta, Patricia, Marta, Mariela, Mario, Maribel, Jose María, Rosario, Lola, Houde y Giusy. A los que “sufrieron” conmigo y ya son Doctores; María, por tus ánimos en la recta final de esta tesis, Isa, Quique y David.

A mis compañeros del Área de Toxicología del ISCIII, gracias por vuestra paciencia durante estos dos últimos años de tesis. A Argelia Castaño por transmitirme que puedo contar con ella en todo momento, por su apoyo y ayuda en los momentos más difíciles. A Antonio por escucharme, por sus consejos (técnicos y personales) y por su amistad. A Carmen, por estar siempre dispuesta a ayudar y por aportar, en cada momento, la solución perfecta. A María R., Silvia y Marta E., gracias por vuestra complicidad y por hacerme sonreír cada mañana. A Mónica y Olga por su compañía en las largas tardes de escritura. A Gema Díaz, Mercedes Núñez, Ana R., Ana L., María M., Marta S., Charo, Maribel y Paqui por vuestra ayuda y por aguantar todas las molestias ocasionadas por los ensayos de toxicidad de esta tesis.

A mi familia madrileña, por todo su cariño. A Charo y M^a Luisa por sus cuidados desinteresados y por tratarme como a una hija. A mi cuñi, por su amistad y compañía. A Manolo, por formar parte de la familia. A mis sobris, mis chiquininos, a Gonzalo, por sus sonrisas y juegos diarios y a Manuel, por los futuros.

A mis hermanos y primos, y a Barby, por ayudarme a “desconectar” durante los fines de semana conquenses y por cuidarme tanto. A María por escucharme.

Y como no, a mis padres por darme oportunidades que ellos nunca tuvieron, que me han permitido estar donde estoy y ser lo que soy. A ti mamá, por tu comprensión, preocupación y cariño constante. A ti papá, por tu trabajo y esfuerzo, por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme que todo esfuerzo tiene al final su recompensa.

A Benja, por aguantar serenamente a mi lado todo el proceso, por soportar el mal humor y las ausencias que esta tesis ha supuesto, por hacerme reír en los malos momentos, por tu ayuda en el laboratorio los sábados y domingos “picando colonias”, por tu paciencia al escuchar las maravillas del “*parafumárico*”, por tus consejos, por tu apoyo, por tu sonrisa, y, sobre todo, por tu cariño.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Summary

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LACASAS	3
1.1.1. ASPECTOS GENERALES: DISTRIBUCIÓN	3
1.1.2. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS LACASAS	4
1.1.3. ESTRUCTURA MOLECULAR Y MECANISMOS CATALÍTICOS	5
1.1.4. MODULACIÓN DEL POTENCIAL REDOX	9
1.1.5. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LAS LACASAS.....	11
1.1.6. BIODEGRADACIÓN DE LA LIGNINA.....	12
1.2. SISTEMA LACASA-MEDIADOR.....	15
1.3. MEDIADORES DE LACASA DE ORIGEN NATURAL	18
1.4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LACASAS Y SISTEMAS LACASA-MEDIADOR.....	20
1.4.1. APLICACIONES INDUSTRIALES	20
1.4.1.1. Industria papelera	20
1.4.1.2. Fabricación de tableros y productos con nuevas propiedades	21
1.4.1.3. Industria alimentaria	21
1.4.1.4. Industria cosmética	22
1.4.1.5. Industria textil.....	22
1.4.1.6. Nanobiotecnología	22
1.4.1.7. Síntesis orgánica	22
1.4.2. PROCESOS DE DESCONTAMINACIÓN Y DETOXIFICACIÓN....	23
1.5. DISEÑO DE ENZIMAS POR EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA	26
1.5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO HUÉSPED HETERÓLOGO EN ENSAYOS DE EVOLUCIÓN DIRIGIDA	29
1.5.2. CREACIÓN DE VARIABILIDAD GÉNICA	31
1.5.2.1. Mutagénesis aleatoria	31
1.5.2.2. Métodos de recombinación.....	33
1.5.3. METODOLOGÍAS DE SCREENING	35
1.5.4. EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LACASAS DE ALTO POTENCIAL REDOX.....	37

2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
TABLAS DE COMPUESTOS Y REACTIVOS UTILIZADOS	45
3.1. MEDIADORES REDOX DE LACASA DE ORIGEN NATURAL.....	48
3.1.1. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA LACASA DE <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	48
3.1.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	48
3.1.2.1. Determinación de proteínas.....	48
3.1.2.2. Valoración de actividad lacasa	49
3.1.2.3. Cálculo de parámetros cinéticos.....	49
3.1.3. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS RELACIONADOS CON LA LIGNINA	50
3.1.3.1. Efecto sobre el crecimiento de <i>P. cinnabarinus</i> en placa	50
3.1.3.2. Capacidad antioxidante: Ensayo TEAC	50
3.1.3.3. Capacidad mediadora de los ácidos <i>p</i> -hidroxicinámicos en reacciones con lacasa y ABTS.....	51
3.1.4. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR LACASA Y FENOLES RELACIONADOS CON LA LIGNINA	51
3.1.4.1. Ensayo colorimétrico de detección de 9,10-antraquinona a partir de antraceno.....	51
3.1.4.2. Ensayos de transformación de PAHs por lacasa en presencia de mediadores naturales.....	52
3.1.4.3. Cuantificación de la transformación de PAHs	53
3.1.4.4. Extracción e identificación de productos minoritarios de oxidación de PAHs	53
3.1.4.5. Identificación de los productos de oxidación de PAHs por lacasa-ABTS mediante LC/MS	54
3.1.4.6. Ensayos toxicológicos.....	55
◉Microtox®	55
◉Inhibición del crecimiento de <i>Scenedesmus subspicatus</i>	55
◉Inhibición de la movilidad de <i>Daphnia magna</i>	56
3.1.4.7. Peroxidación de lípidos: Producción de TBARS	56
3.1.4.8. Oxidación de fenantreno vía peroxidación de lípidos con lacasa y ácido <i>p</i> -cumárico	56
3.1.5. OXIDACIÓN DE COLORANTES POR LACASA Y ÁCIDOS <i>p</i>- HIDROXICINÁMICOS	57

3.1.5.1. Decoloración de diferentes tipos de colorantes	57
3.1.5.2. Inhibición de la decoloración.....	57
3.1.5.3. Ensayos con siringaresinol.....	57
3.1.5.4. Evaluación de la toxicidad: Microtox®	58
3.2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LACASAS DE ALTO POTENCIAL	
 REDOX	59
3.2.1. MICROORGANISMOS	59
3.2.2. VECTORES PLASMÍDICOS	59
3.2.3. GEN PARENTAL DE LA LACASA DE <i>P. cinnabarinus</i>	60
3.2.4. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....	60
3.2.4.1. Medios de cultivo para bacterias (<i>E. coli</i>).....	60
3.2.4.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	61
3.2.4.3. Soluciones y tampones	62
3.2.5. MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS	63
3.2.6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	64
3.2.6.1. Análisis y cuantificación de ácidos nucleicos.....	64
3.2.6.2. Purificación de fragmentos de ADN	65
3.2.6.3. Oligonucleótidos	65
3.2.6.4. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias.....	65
3.2.6.5. Linearización del vector pJRoC30	66
3.2.6.6. Construcción de pJRoC30 α -PcL	66
3.2.7. DESARROLLO DEL PROTOCOLO DE <i>HIGH-THROUGHPUT</i>	
 <i>SCREENING</i>	70
3.2.7.1. Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i>	70
3.2.7.2. Optimización de las condiciones de inducción en microcultivos	70
3.2.7.3. Preparación de las librerías para <i>High-Throughput Screening</i>	71
3.2.7.3.1. Ensayos colorimétricos	71
3.2.8. PROCESO DE EVOLUCIÓN DE LA LACASA DE <i>P. cinnabarinus</i>..	75
3.2.8.1. Condiciones de PCR mutagénica.....	75
3.2.8.2. Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima II.....	76
3.2.8.3. Segunda generación: PCR mutagénica con Taq/MnCl ₂ y barajado <i>in vivo</i> de ADN.....	76
3.2.8.4. Tercera generación: PCR mutagénica con Taq/MnCl ₂ y barajado <i>in vivo</i> de ADN.....	77
3.2.9. MUTAGÉNESIS DE LOS RESIDUOS R(α2)S Y A240P	
 MEDIANTE IVOE	77
3.2.10. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA VARIANTE 7A9	79
3.2.10.1. Optimización de las condiciones de producción	79
3.2.10.1.1. Efecto de la concentración de cobre	79

3.2.10.1.2. Efecto de la temperatura	79
3.2.10.2. Producción de la variante 7A9	79
3.2.10.3. Purificación de la variante 7A9	80
3.2.11. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA VARIANTE 7A9	81
3.2.11.1. Electroforesis SDS-PAGE y desglicosilación	81
3.2.11.2. Cálculo de parámetros cinéticos	81
3.2.11.3. Estabilidad frente a temperatura	82
3.2.11.4. pH óptimo	82
4. RESULTADOS	83
4.1. MEDIADORES REDOX DE LACASA DE ORIGEN NATURAL	85
4.1.1. PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	
RELACIONADOS CON LA LIGNINA	85
4.1.1.1. Efecto sobre el crecimiento de <i>P. cinnabarinus</i> en placa	85
4.1.1.2. Caracterización como sustratos de lacasa	87
4.1.1.3. Capacidad antioxidante	87
4.1.1.4. Capacidad mediadora de los ácidos <i>p</i> -hidroxicinámicos en reacciones con lacasa-ABTS	89
4.1.2. TRANSFORMACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS	
POLICÍCLICOS POR LACASA Y MEDIADORES NATURALES	92
4.1.2.1. Screening de mediadores naturales	92
4.1.2.2. Oxidación de antraceno con lacasa y ácido <i>p</i> -cumárico	94
4.1.2.3. Oxidación de benzo[a]pireno por lacasa y mediadores naturales	97
4.1.2.4. Análisis de los productos de oxidación del benzo[a]pireno	97
4.1.2.5. Degradación de diferentes PAHs por lacasa y ácido <i>p</i> -cumárico	101
4.1.2.6. Reducción de la toxicidad de PAHs tras su oxidación por lacasa y ácido <i>p</i> -cumárico	102
4.1.2.7. Peroxidación de lípidos como vía extra de oxidación de PAHs recalcitrantes con lacasa y ácido <i>p</i> -cumárico	103
⊗ Peroxidación de lípidos	103
⊗ Oxidación de Fenantreno	104
4.1.3. OXIDACIÓN DE COLORANTES POR LACASA Y ÁCIDOS <i>p</i>-	
HIDROXICINÁMICOS COMO MEDIADORES NATURALES	106
4.1.3.1. Decoloración de diferentes tipos de colorantes	107
4.1.3.2. Estudios de inhibición de la decoloración con ácido ferúlico	113
4.1.3.3. Estudios de decoloración con siringaresinol como mediador	114
4.2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LACASAS DE ALTO POTENCIAL	
REDOX	116
4.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN EN	
MICROCULTIVOS	116

4.2.1.1. Efecto de las condiciones de inducción en el crecimiento	116
4.2.1.2. Efecto de las condiciones de inducción en la producción de lacasa	117
4.2.2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LA LACASA DE <i>P. cinnabarinus</i>.....	118
4.2.2.1. Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima II.....	118
4.2.2.2. Segunda generación: PCR mutagénica con Taq/MnCl ₂ y barajado <i>in vivo</i> de ADN.....	121
4.2.2.3. Tercera generación: PCR mutagénica con Taq/MnCl ₂ y barajado <i>in vivo</i> de ADN.....	122
4.2.3. MUTAGÉNESIS DE LOS RESIDUOS R(α2)S Y A240P MEDIANTE IVOE	126
4.2.4. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA VARIANTE 7A9.....	127
4.2.4.1. Optimización de las condiciones de producción	127
4.2.4.1.1. Efecto de la concentración de cobre	127
4.2.4.1.2. Efecto de la temperatura.....	127
4.2.4.2. Purificación de la variante 7A9	128
4.2.5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA VARIANTE 7A9.....	131
4.2.5.1. Electroforesis SDS-PAGE y desglicosilación	131
4.2.5.2. Cálculo de parámetros cinéticos.....	131
4.2.5.3. Estabilidad frente a temperatura.....	131
4.2.5.4. pH óptimo	132
5. DISCUSIÓN	133
5.1. MEDIADORES REDOX DE LACASA DE ORIGEN NATURAL	135
5.1.1. COMPUESTOS FENÓLICOS RELACIONADOS CON LA LIGNINA	135
5.1.1.1. Actividad antioxidante.....	135
5.1.1.2. Compuestos fenólicos como sustratos de lacasa.....	137
5.1.2. DEMOSTRACIÓN DE LA CAPACIDAD MEDIADORA DE ESTOS COMPUESTOS	137
5.1.2.1. Degradación de PAHs	138
5.1.2.2. Oxidación de colorantes	141
5.1.2.3. Peroxidación de lípidos	144
5.1.3. MECANISMOS DE OXIDACIÓN UTILIZADOS POR LACASA Y ÁCIDOS <i>p</i>-HIDROXICINÁMICOS COMO MEDIADORES	146
5.1.3.1. Vía de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) <i>versus</i> vía de transferencia de un electrón (ET)	146
5.1.3.2. Productos del acoplamiento oxidativo de radicales fenoxilo como mediadores de lacasa	148
5.1.3.3. Cinéticas de oxidación de ABTS por lacasa y ácidos <i>p</i> -hidroxicinámicos	149

5.1.3.4. Peroxidación de lípidos como vía extra para la oxidación de PAHs recalcitrantes.....	151
5.1.4. PAPEL DE LA LACASA Y LOS MEDIADORES NATURALES EN LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS RECALCITRANTES.....	152
5.2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LACASAS DE ALTO POTENCIAL REDOX.....	155
5.2.1. EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA LACASA DE <i>P. cinnabarinus</i> EN <i>S. cerevisiae</i>	155
5.2.1.1. Construcción de α -PcL.....	155
5.2.1.2. Optimización de las condiciones de inducción de lacasa	156
5.2.1.3. Ensayo sistemático de actividad.....	158
5.2.2. ESTRATEGIA DEL PROCESO EVOLUTIVO.....	158
5.2.3. MUTACIONES INTRODUCIDAS DURANTE EL PROCESO DE EVOLUCIÓN DIRIGIDA	160
5.2.4. MUTAGÉNESIS DE LOS RESIDUOS R(α 2)S Y A240P MEDIANTE IVOE	165
5.2.5. CARACTERIZACIÓN DE LA VARIANTE 7A9	166
6. CONCLUSIONES	169
7. BIBLIOGRAFÍA.....	173
8. ANEXO	207

ABREVIATURAS

Aminoácidos	Ácido Aspártico	Asp	D
	Ácido Glutámico	Glu	E
	Alanina	Ala	A
	Arginina	Arg	R
	Asparagina	Asn	N
	Cisteína	Cys	C
	Fenilalanina	Phe	F
	Glicina	Gly	G
	Glutamina	Gln	Q
	Histidina	His	H
	Isoleucina	Ile	I
	Leucina	Leu	L
	Lisina	Lys	K
	Metionina	Met	M
	Prolina	Pro	P
	Serina	Ser	S
	Tirosina	Tyr	Y
	Treonina	Thr	T
	Triptofano	Trp	W
	Valina	Val	V

Abs	Absorbancia
ABTS	2,2' Azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i> (ionización química a presión atmosférica)
BSA	Albumina de suero bovino
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DMP	2,6-Dimetoxifenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
E⁰	Potencial redox
ECF	<i>Elemental Chlorine Free</i> (libre de cloro elemental)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPR	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> (resonancia paramagnética electrónica)

epPCR	<i>Error prone PCR</i> (PCR propensa a error)
ET	<i>Electron Transfer</i> (transferencia de un electrón)
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i> (transferencia de un átomo de hidrógeno)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografía líquida de alta resolución)
HBT	1-Hidroxibenzotriazol
HTP	<i>High-throughput</i> (sistemático o de alto rendimiento)
IVOE	<i>In Vivo Overlap Extension</i> (extensión por solapamiento <i>in vivo</i>)
k_{cat}	Constante catalítica
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LiP	Lignina peroxidasa
MOPS	Ácido 4-mofolinpropanosulfónico
MnP	Manganeso peroxidasa
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (espectrometría de masas)
NAG	N-acetilglucosamina
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (resonancia magnética nuclear)
<i>o/n</i>	<i>Over night</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida)
PAH	Hidrocarburo aromático policíclico
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PcL	Lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
PCU	Ácido <i>p</i> -cumárico
pI	Punto isoelectrico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SOE	<i>Sequence Overlap Extension</i> (extensión por solapamiento <i>in vitro</i>)
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TCF	<i>Total Chlorine Free</i> (totalmente libre de cloro)
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a la de Trolox
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiléndiamina
UV	Ultravioleta
VP	Peroxidasa versátil
ϵ	Coefficiente de extinción molar
λ	Longitud de onda

Summary

The use of environmentally-friendly redox mediators easily available at low cost together with the design of tailor-made laccases, more stable or with improved catalytic efficiencies, could smooth the progress of application of laccase-mediator systems in decontaminating or white-biotechnological industrial processes. This thesis comprises both, searching of alternative laccase mediators of natural origin and directed evolution of the high-redox potential laccase from the fungus *Pycnoporus cinnabarinus*.

The mediating capabilities of naturally-occurring phenolic compounds, related to the lignin polymer, were demonstrated during oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and dyes, by *P. cinnabarinus* laccase. Moreover, relevant pieces of evidence on the mechanisms followed by these laccase-natural mediator systems were also given.

p-Hydroxycinnamic acids possess significantly higher antioxidant activity than benzylic phenols, as showed by the TEAC assay. However, they are also capable to act as efficient laccase redox mediators once oxidized by the enzyme, promoting the oxidation of recalcitrant aromatic compounds.

Vanillin, acetovanillone, ferulic acid and *p*-coumaric acid significantly promoted oxidative transformation of PAH by laccase. The outstanding efficiency of *p*-coumaric acid (PCA) as laccase mediator resulted close similar to that of HBT. Complete removal of anthracene and benzo[a]pyrene and 50 % transformation of pyrene were attained with laccase-PCA (laccase alone only oxidized anthracene). Quinones were detected as oxidation products of anthracene and benzo[a]pyrene by laccase and natural mediators (and HBT or ABTS). However, 6-benzo[a]pyrenyl acetate accumulated during transformation of benzo[a]pyrene by laccase-ABTS but was not detected with HBT or PCA. The absence of this intermediate upholds the dissimilarity of the oxidation mechanisms followed by laccase-PCA and laccase-HBT (HAT) *vs* laccase-ABTS (ET).

The recalcitrance of phenanthrene hinders its oxidation by the enzyme even in the presence of PCA or HBT. However, in the presence of unsaturated fatty acids phenanthrene was efficiently transformed by laccase-PCA (and laccase-HBT). The involvement of lipid peroxidation reactions, forming peroxy radicals that acted as strong oxidizers, was confirmed by the TBARS assay.

Among the three *p*-hydroxycinnamic acids, sinapic acid (SA) was the best substrate of *P. cinnabarinus* laccase (specificity constant 400-fold PCA) and

caused the fastest dye decolorization. The strong mediating capacity of SA might be explained by its fast oxidation by the enzyme, producing high concentration of phenoxyl radicals. Their high tendency for β - β' coupling generates phenolic dimers that would act as laccase mediators, as demonstrated here with syringaresinol.

The design of enzymes by directed evolution consists of generating genetic diversity by induced mutagenesis or recombination of the gene(s) under study, expression of this diversity and selection of the best mutants at the conditions the enzyme is wanted to be improved. Successive evolution rounds will provide the accumulation of beneficial mutations and the desired feature.

Directed evolution of *P. cinnabarinus* laccase (PcL) requires its expression in *S. cerevisiae*, the heterologous host used in the evolution assays. Unfortunately, expression of basidiomycete laccases in *S. cerevisiae* is a hard task. In order to achieve the functional expression of the enzyme, the signal sequence of the protein was replaced by the sequence of the *S. cerevisiae* α factor pre-proleader (α -PcL). Optimization of the expression conditions was also accomplished by adding ethanol and mM concentrations of CuSO_4 to the medium, and lowering the incubation temperature.

The complete α -PcL sequence was submitted to the evolution process in order to improve both laccase expression in yeast and catalytic activity. The use of two polymerases with different mutagenic biases enhanced the genetic variability generated by random mutagenesis. The *in vivo* recombination of the resulting DNA enhanced this diversity, and promoted the accumulation of beneficial mutations incorporated in successive evolution rounds. High-throughput screening of the libraries was based in two different colorimetric assays with ABTS and 2,6-dimethoxyphenol.

After three evolution rounds, laccase activity in *S. cerevisiae* microcultures was enhanced 800 fold. The selected mutant (7A9) possessed seven beneficial mutations. Four of them are located in the α factor pre-proleader and would be responsible for increasing protein secretion rates. The other three are located in the mature protein; two of them in the CuT1 environment would be related to the improvement of enzymatic features.

The evolved PcL variant (7A9) presented 6-fold improvement of catalytic efficiency for ABTS oxidation, was rather more thermostable and more active at neutral pH than wild PcL.

1. Introducción

1.1. LACASAS

1.1.1. ASPECTOS GENERALES: DISTRIBUCIÓN

Las lacasas son proteínas multicobre con actividad fenoloxidasa (EC 1.10.3.2, bencenodiol:oxígeno oxidorreductasas) que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, liberando agua al utilizar el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Thurston, 1994).

Pertenecen a la superfamilia de las oxidasas azules que engloba a pequeñas proteínas (azurina, plastocianina o rusticianina) y a las proteínas de la familia de las oxidasas multicobre a la que pertenecen las lacasas junto con la ascorbato oxidasa de plantas o la ceruloplasmina del plasma de mamíferos (Messerschmidt *et al.*, 1990; Messerschmidt *et al.*, 2001). Es una de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde finales del siglo XIX, cuando se descubrió en el árbol japonés de la laca *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883), del que tomó su nombre. Unos años después se describió en hongos (Yoshida, 1883; Bertrand, 1896), y posteriormente en otras plantas, bacterias e incluso insectos (Gianfreda *et al.*, 1999).

Las lacasas son secretadas al medio extracelular por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos, siendo los basidiomicetos de podredumbre blanca de la madera los que más lacasa producen (Gianfreda *et al.*, 1999). Así mismo, la producción de lacasas está muy extendida en especies de hongos saprófitos del suelo, y también en hongos ectomicorrizógenos (Luis *et al.*, 2004).

En plantas superiores han sido descritas en la familia Anacardiaceae (Huttermann *et al.*, 2001) (a la cual pertenece *Rhus vernicifera*), en *Acer pseudoplatanus*, *Pinus taeda*, *Aesculus parviflora* y *Populus euramericana* (Mayer *et al.*, 2002). Hasta finales del siglo XX, las lacasas se habían encontrado únicamente en organismos eucariotas, sin embargo, actualmente existen datos que evidencian la existencia de lacasas intracelulares o periplasmáticas en procariotas. Se describieron por primera vez en *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993) y posteriormente se han hallado en bacterias como *Marinomonas mediterranea*, *Mycobacterium tuberculosis* o en las esporas de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus subtilis* (Claus, 2004). Probablemente, las lacasas bacterianas mejor caracterizadas sean las de *B. subtilis* y *Sinorhizobium meliloti* (Martins *et al.*, 2002; Rosconi *et al.*, 2005). También se han descrito enzimas con actividad lacasa en cutículas de

insectos como *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cupreina*, *Manduca sexta* y *Sarcophaga bullata* (Gianfreda *et al.*, 1999).

1.1.2. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS LACASAS

En general, las lacasas son proteínas monoméricas con masas moleculares entre 50 y 100 kDa, aunque se han descrito formas multiméricas como la lacasa de *Agaricus bisporus*, que se presenta como dímeros de unidades iguales, o la lacasa 1 de *Podospora anserina*, que aparece en forma de tetrámeros (Baldrian, 2006). Las lacasas son glicoproteínas con un contenido en carbohidratos de entre el 10 y el 45 %, unidos principalmente a residuos de Asn (Thurston, 1994; Claus, 2004), aunque se han descrito lacasas con solamente un 1 % de glicosilación (Muñoz *et al.*, 1997). El contenido de carbohidratos está implicado en la estabilidad estructural de la proteína y en su protección frente a procesos de proteólisis e inactivación por radicales (Yoshitake *et al.*, 1993; Ko *et al.*, 2001).

Las lacasas son proteínas muy estables, con temperaturas óptimas entre 50 y 70 °C (Morozova *et al.*, 2007b), aunque se pueden encontrar enzimas muy termoestables como la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, con un tiempo de inactivación de 3 horas a 75 °C (Litthauer *et al.*, 2007). Poseen pI entre 2,6 y 4,5 y presentan actividad en un amplio rango de pH, entre 2,0 y 8,5 aunque el máximo se encuentra entre 3,0 y 5,0 (Thurston, 1994; Leonowicz *et al.*, 2001; Morozova *et al.*, 2007b). Poseen potenciales de óxido-reducción entre 0,5 y 0,8 V y catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos, desde compuestos fenólicos (*orto* y *para* difenoles, metoxifenoles, etc) a aminas aromáticas (Yaropolov *et al.*, 1994), e incluso iones inorgánicos (Morozova *et al.*, 2007a). Otras reacciones que pueden llevar a cabo las lacasas son desmetilaciones (Kirk *et al.*, 1987) y deshalogenaciones en el caso de compuestos sustituidos. Su actividad frente a compuestos fenólicos es muy dependiente del pH, ya que el potencial redox de estos compuestos disminuye a medida que se incrementa el pH. Sin embargo, a pH superior a 6 se produce inhibición de la actividad catalítica (Xu, 1997). La actividad lacasa también puede ser inhibida por iones inorgánicos como cloruros y fluoruros o por compuestos orgánicos como cisteína, azida o ácido tioglicólico (Morozova *et al.*, 2007b).

1.1.3. ESTRUCTURA MOLECULAR Y MECANISMOS CATALÍTICOS

Las lacasas forman parte de la familia de las oxidasas multicobre que llevan a cabo la oxidación del sustrato gracias a la presencia de cuatro átomos de cobre agrupados en tres sitios de oxido-reducción, identificados en base a sus propiedades espectroscópicas (Claus, 2004):

- Tipo 1 (T1): el cobre “azul” paramagnético presenta fuerte absorción en torno a 600 nm, lo cual confiere a estas enzimas su característico color azul en estado oxidado. Esta intensa absorción se debe al enlace entre el cobre y el átomo de azufre del residuo de Cys que lo coordina. El átomo de cobre tiene propiedades paramagnéticas en estudios de EPR, causando un desplazamiento hiperfino paralelo en el espectro (Leontievsky *et al.*, 1997).
- Tipo 2 (T2): este átomo de cobre absorbe ligeramente en la región del visible y tiene propiedades paramagnéticas características en el espectro de EPR.
- Tipo 3 (T3): se trata de un centro binuclear formado por dos átomos de cobre acoplados anti-ferromagnéticamente, lo que provoca la ausencia total de señal de EPR. El par T3 presenta un ligero hombro de absorción en el espectro UV alrededor de 330 nm, que desaparece tras su reducción (Claus, 2004).

En el sitio de cobre T1 tiene lugar la oxidación del sustrato reductor, mientras que la reducción del oxígeno a agua se produce en el centro trinuclear formado por el cobre T2 y los dos cobres T3.

La enzima se reduce tras captar cuatro electrones del sustrato reductor. En la enzima reducida no existe conexión entre el cobre T2 y los dos cobres T3, de manera que cuando se produce la interacción con el oxígeno molecular se generan dos intermediarios de la lacasa, en los que los átomos de cobre están coordinados a través de los átomos de oxígeno (Figura 1.1). El intermediario nativo se puede transformar en la forma completamente oxidada, cuyo cobre T1 puede ser de nuevo reducido por el sustrato (Shleev *et al.*, 2006b). Sin embargo, lo normal es que el intermediario nativo pase a la forma reducida tras cuatro oxidaciones monoelectrónicas del sustrato reductor. La lacasa actuaría como una batería acumulando un electrón de cada molécula de sustrato hasta tener los cuatro necesarios para reducir una molécula de oxígeno a agua. El primer paso de reducción del centro T1 por

el sustrato constituye el paso limitante en el ciclo de oxidorreducción de las lacasas (Xu, 1996). De forma global, se ha propuesto un mecanismo catalítico de tipo ping-pong bisustrato, en el que los productos de la reacción son liberados antes de que tenga lugar la unión de nuevos sustratos (Petersen *et al.*, 1978).

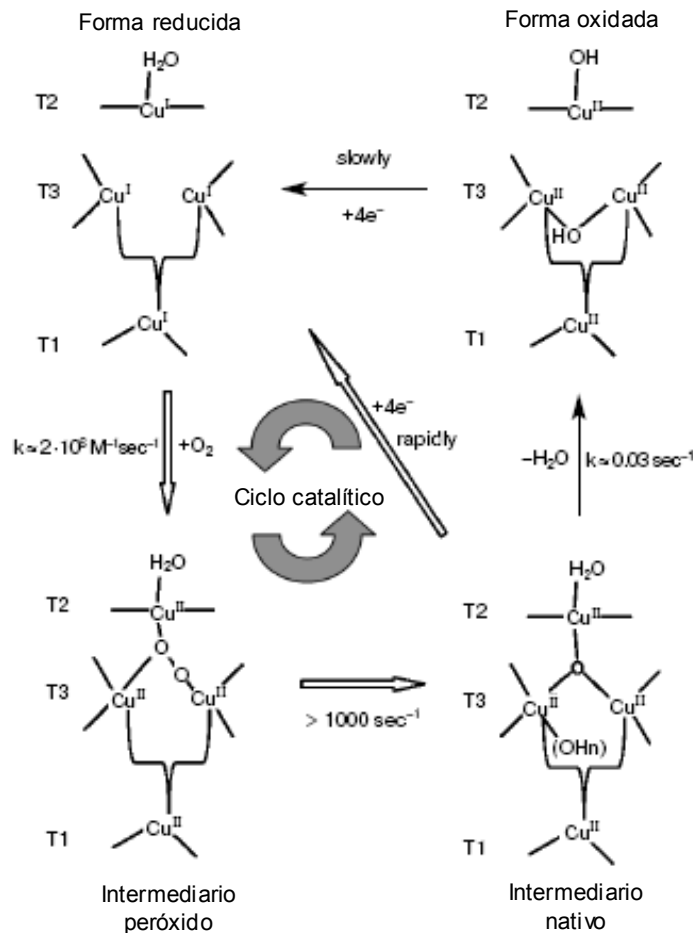


Figura 1.1. Ciclo catalítico de las lacasas. Se muestra el mecanismo de reducción y oxidación de los sitios de cobre de la enzima. (Shleev *et al.*, 2006a).

Hasta la fecha, se ha resuelto la estructura cristalina tridimensional de la lacasa bacteriana CotA de la endoespora de *B. subtilis* (Enguita *et al.*, 2003), y la de cinco lacasas fúngicas: *Copriopsis cinerea* (sinónimo *Coprinus cinereus*) (Ducros *et al.*, 1998), *Trametes versicolor* (Bertrand *et al.*, 2002; Piontek *et al.*, 2002), *Pycnoporus cinnabarinus* (Figura 1.2) (Antorini *et al.*, 2002), *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen *et al.*, 2002) y *Rigidoporus lignosus* (Garavaglia *et al.*, 2004). El alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de lacasas y la resolución de su estructura ha permitido identificar características conservadas en todas ellas, en cuanto a estructura

terciaria de los sitios redox y coordinación de los iones de cobre (Kumar *et al.*, 2003; Valderrama *et al.*, 2003; Claus, 2004).

Las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las lacasas fúngicas codifican una cadena polipeptídica de entre 520 y 550 aminoácidos. El plegamiento estructural de las lacasas está configurado en tres dominios de tipo cupredoxina con arquitectura tipo barril- β , estabilizados por varios puentes disulfuro. Esta estructura está muy relacionada con la de pequeñas proteínas de cobre como la azurina o la plastocianina, sugiriendo su evolución a partir de un antecesor único (Murphy *et al.*, 2000; Claus, 2004).

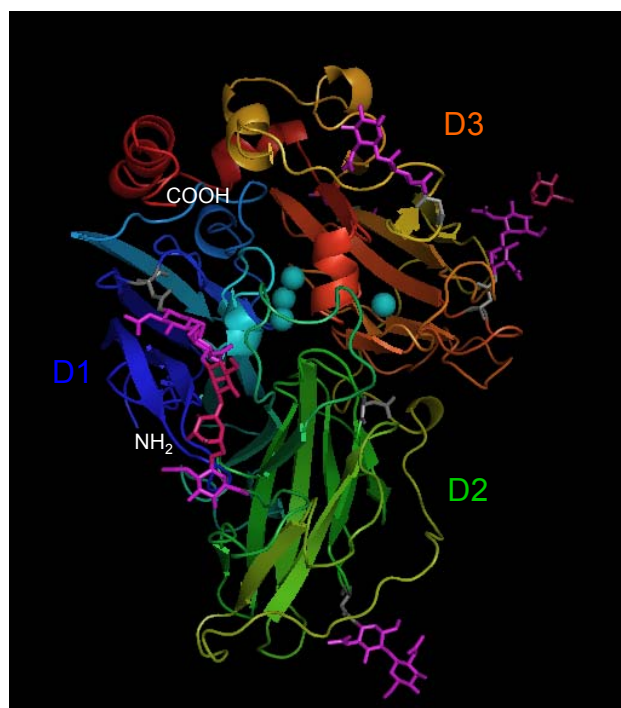


Figura 1.2. Estructura tridimensional de la lacasa de *P. cinnabarinus*. Se muestran los tres dominios de tipo cupredoxina (D1, D2 y D3), los cuatro cobres catalíticos y las cadenas de N-acetilglucosamina-manosa en los sitios de N-glicosilación.

En el dominio 3 se encuentra un bolsillo hidrofóbico que contiene el sitio de cobre T1, y en sus proximidades el sustrato reductor se une a una pequeña cavidad cargada negativamente, que podría estabilizar el radical catiónico que se produce durante su oxidación (Piontek *et al.*, 2002; Claus, 2004). El cluster trinuclear T2/T3 está embebido entre los dominios 1 y 3 y el dominio 2 contiene residuos implicados en la unión del sustrato. El sitio de reducción del oxígeno en el agrupamiento T2/T3 tiene acceso al solvente por dos canales, uno ancho que accede al sitio T3 y otro estrecho que conduce al cobre T2. Estos canales facilitan la entrada del oxígeno molecular y la

liberación de las moléculas de agua (Ducros *et al.*, 1998; Piontek *et al.*, 2002; Hakulinen *et al.*, 2002; Enguita *et al.*, 2003). Por otro lado, la carga negativa en las cercanías del cluster trinuclear, aportada por cuatro residuos conservados de Asp y Glu, estabilizaría la alta carga positiva en este *cluster* y modularía sus propiedades redox (y posiciones de coordinación libres) contribuyendo a su reactividad con el oxígeno molecular (Quintanar *et al.*, 2005).

Los tres átomos de cobre del centro trinuclear forman un triángulo regular perfecto. Los dos átomos de cobre del sitio T3 están coordinados por seis His y en la forma oxidada, se mantienen unidos por un puente hidroxilo. Otras dos His coordinan el cobre T2. El cobre T1 está coordinado por dos His y una Cys (Piontek *et al.*, 2002; Valderrama *et al.*, 2003; Claus, 2004). El sitio activo de las lacasas, formado por los cuatro cobres y los diez residuos de His y uno de Cys que actúan como ligandos, está altamente conservado en lo que se refiere a la geometría de los cobres, los dos canales que dan acceso al oxígeno molecular y la ruta de transferencia de electrones entre el cobre T1 y el centro T2/T3 (Thurston, 1994; Valderrama *et al.*, 2003; Claus, 2004). Los electrones extraídos del sustrato reductor por el cobre T1 son transferidos a través del tripéptido His-Cys-His, al centro trinuclear, donde tiene lugar la reducción del oxígeno a agua (Figura 1.3).

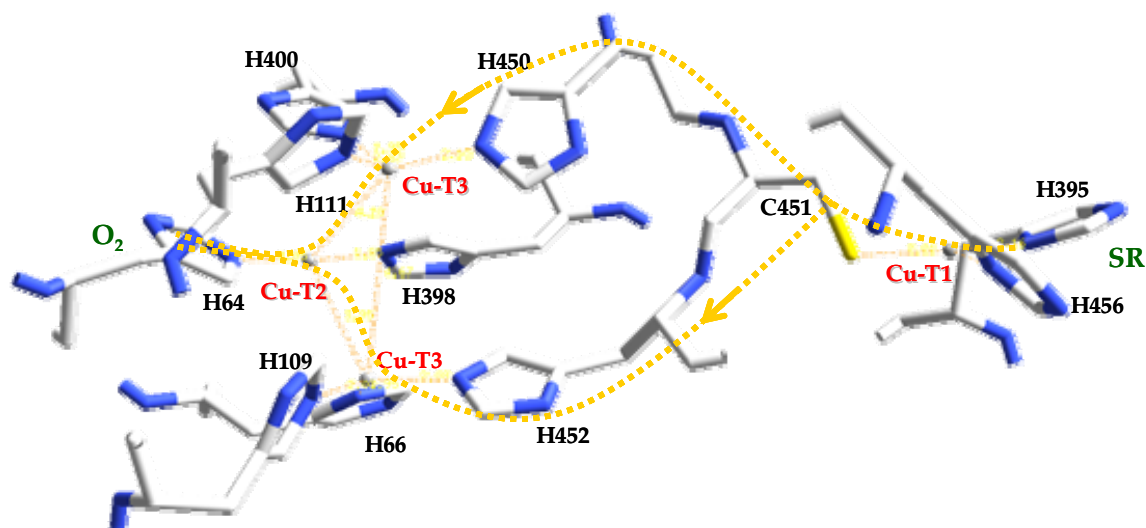


Figura 1.3. Transferencia electrónica desde el sustrato reductor (SR) hasta el oxígeno en el sitio activo de la lacasa de *P. cinnabarinus*.

Los once ligandos de los iones de cobre se encuentran localizados dentro de cuatro segmentos de secuencia de entre 8 y 24 residuos (L1-L4)

característicos de las lacasas (Tabla 1.1). Dentro de estas regiones, los residuos que no participan en la coordinación de los cobres también están conservados o semiconservados para mantener el empaquetamiento tridimensional local en las lacasas, y difieren de los residuos de otras oxidasas multicobre. Además existe una homología intraproteica entre L1 y L3, así como entre L2 y L4 lo cual sugiere la existencia de un evento temprano de duplicación en la evolución de las lacasas (Kumar *et al.*, 2003; Valderrama *et al.*, 2003; Claus, 2004).

1.1.4. MODULACIÓN DEL POTENCIAL REDOX

A diferencia de lo que ocurre en las lacasas fúngicas, el sitio de cobre T1 en las lacasas bacterianas, de plantas y en el resto de oxidasas multicobre, posee una coordinación tetragonal dominada por dos residuos de His, un residuo de Cys y un residuo de Met que actúa como ligando axial (situado a 2,9 Å del átomo de cobre T1 en la lacasa CotA de *B. subtilis*). En las lacasas fúngicas, la posición del ligando axial está ocupada por un residuo hidrofóbico, que puede ser una Phe o una Leu, y que se encuentra a una distancia del cobre superior (3,6 Å en la lacasa de *T. versicolor*), por lo que no participaría en la coordinación, presentando por ello una geometría planar trigonal.

En base a estudios de alineamiento de secuencias y comparaciones estructurales de diferentes oxidasas multicobre, se ha propuesto un efecto modulador del potencial redox (E^0) para el residuo que ocupa la posición del ligando axial del cobre T1. El E^0 de las lacasas está determinado por la energía requerida para extraer un electrón del sustrato reductor por el cobre T1. Entre las lacasas fúngicas se localizan los E^0 (cobre T1) más elevados, en torno a 790 mV, frente a los 430 mV detectados en las lacasas de plantas o bacterianas.

La ausencia del residuo de Met puede provocar una disminución de la densidad electrónica del átomo de cobre, incrementando la energía de ionización y por lo tanto el E^0 del cobre T1. Este hecho fue corroborado al conseguir una reducción de 0,1 V en el potencial redox de la lacasa de *T. versicolor* tras la sustitución del ligando axial Phe por una Met (Xu *et al.*, 1999), y un incremento equivalente en la oxidasa azurina y la lacasa bacteriana CotA, tras sustituir su Met axial por una Leu o Phe (Farver *et al.*, 1993; Durao *et al.*, 2006). Una detallada comparación estructural entre

lacasas fúngicas reveló diferencias estructurales en el residuo de coordinación axial del cobre T1 entre lacasas de bajo E^0 (*C. cinerea*) y de alto E^0 (*T. versicolor*) (Bertrand *et al.*, 2002; Piontek *et al.*, 2002), ya que la primera posee una Leu mientras que la segunda una Phe. Se podría pensar por tanto, que una Phe en la posición axial es la responsable del alto potencial redox de la lacasa de *T. versicolor*. Sin embargo las lacasas de *Neurospora crassa* y *Rhizoctonia solani* poseen un alto E^0 a pesar de tener una Leu como ligando axial (Tabla 1.1). Además, estudios mutagénicos que implican la sustitución de Phe por Leu o a la inversa no han tenido efecto en el E^0 de las lacasas de *Myceliophthora thermophila* y *R. solani* (Xu *et al.*, 1998), sugiriendo la existencia de otros factores implicados en la modulación del E^0 de las lacasas fúngicas.

Tabla 1.1. Alineamiento de secuencias de las cuatro regiones conservadas que contienen los ligandos de cobre del sitio activo de la ascorbato oxidasa y de diferentes lacasas. En color fucsia aparecen los ligandos de His de los átomos de cobre. En rojo, el ligando de Cys del cobre T1. En verde, el ligando axial del cobre T1 y en azul, el tripéptido, ambos supuestamente involucrados en la modulación del potencial redox. AO: Ascorbato oxidasa, RVE: *Rhus vernicifera*, CCI: *Coprinus cinerea*, MTH: *Myceliophthora thermophila*, NCR: *Neurospora crassa*, RSO: *Rhizoctonia Solani*, PM1: lacasa del basidiomiceto PM1, TVI: *Trametes villosa*, TVE: *Trametes versicolor* y PCI: *Pycnoporus cinnabarinus*.

Lacasa	E^0 (mV)	Ligandos de los sitios de cobre			
		L1	L2	L3	L4
		T2 T3	T3 T3	T1 T2 T3	T3 T1 T3 T1
AO	340	60 VIHWGI 66	104 FYHGHLMQ 112	446 IHPWHLGH 454	509 HCHIEPHLMGM 520
RVE	430	57 TIHWGV 63	102 WWHAHSDWT 108	432 SHPMHLGH 440	494 HCHFERHTTEGM 503
CCI	550	62 SIHWGL 68	107 WYHSHFGTQ 115	395 PHPFHLGH 403	451 HCHIEFHLMNGL 462
MTH	470	95 SIHWGL 101	140 WYHSHFSAQ 149	434 PHPMHLGH 442	502 HCHIAWHVSGGL 513
NCR	780	98 SIHWGM 104	143 WYHSHFSAQ 151	427 PHP IHLGH 435	500 HCHIAWHVSGGL 511
RSO	710	61 SIHWGL 67	106 WYHSHLSSQ 114	406 THPVHLGH 414	459 HCHIDWHLEAGF 470
PM1	790	62 SIHWGF 68	107 WYHSHLSTQ 115	392 PHPFHLGH 400	453 HCHIDFHLEAGF 464
TVI	790	62 SIHWGF 68	107 WYHSHLSTQ 115	394 PHPFHLGH 402	452 HCHIDFHLEAGF 463
TVE	790	62 SIHWGF 68	107 WYHSHLSTQ 115	395 PHPFHLGH 403	454 HCHIDFHLEAGF 465
PCI	790	62 SIHWGF 68	107 WYHSHLSTQ 115	394 PHPFHLGH 402	450 HCHIDFHLDAGF 461

Por otro lado, la distancia entre el cobre T1 y el nitrógeno δ de uno de sus ligandos de His (His 458), parece contribuir también en la modulación del potencial redox de las lacasas fúngicas. Esta teoría surge de las diferencias estructurales encontradas entre la lacasa de *T. versicolor* y la de *C. cinerea* (de menor potencial redox). En el primer caso la distancia es mayor, teniendo

como consecuencia una menor contribución del par de electrones libres del átomo de nitrógeno de la His hacia el cobre T1, produciendo una mayor deficiencia electrónica de éste e incrementando, por tanto, el E^0 (Piontek *et al.*, 2002). Dicha elongación se consigue por la existencia de un puente de hidrógeno entre el residuo Glu 460 y la Ser 113 situada en el dominio opuesto. La lacasa de *C. cinerea* carece de ambos residuos implicados en el puente de hidrógeno (Piontek *et al.*, 2002). El Glu 460 forma parte del tripéptido Leu-Glu-Ala (LEA), adyacente a la His 458, y altamente conservado en las lacasas de alto potencial redox, como por ejemplo las de diferentes especies de *Trametes*, del hongo PM1 o de *R. lignosus* (Garavaglia *et al.*, 2004). Este fenómeno también se produce cuando existe un Asp en la posición del Glu (tripéptido LDA) (Tabla 1.1), como ocurre en la lacasa de *P. cinnabarinus*. Xu y colaboradores construyeron un triple mutante de la lacasa de bajo potencial redox de *M. thermophila* para sustituir VSG por LEA y aunque no observaron un aumento en el potencial redox, los parámetros cinéticos sí sufrieron variaciones (Xu *et al.*, 1998).

1.1.5. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LAS LACASAS

Las lacasas son proteínas presentes en una gran variedad de organismos y con funciones biológicas muy diversas.

Están ampliamente distribuidas en los hongos, y son secretadas de forma abundante por los basidiomicetos ligninolíticos para llevar a cabo una de las funciones más estudiadas y discutidas de las lacasas, la degradación del polímero de lignina, función que se analizará en el siguiente apartado. En los basidiomicetos saprófitos del suelo y ectomicorrizógenos las lacasas intervienen en la degradación de la materia orgánica del suelo y por tanto, en el *turnover* del humus (Jonas *et al.*, 1997). Además, pueden participar en procesos de detoxificación (Gianfreda *et al.*, 2004).

Se ha descrito también su implicación en procesos de esporulación, pigmentación y patogénesis. En *Aspergillus nidulans*, una de sus lacasas está implicada en la coloración verde de los conidios (Aramayo *et al.*, 1990) y la otra en la morfogénesis y en procesos de esporulación (Scherer *et al.*, 2001). Las lacasas se han descrito como un importante factor de virulencia implicado en muchas enfermedades causadas por hongos (Breuil *et al.*, 1999), implicadas en el ataque inicial al hospedador (Lewis *et al.*, 1990), o en la interacción posterior con la célula huésped (Williamson, 1994). Además,

la lacasa puede proteger al hongo patógeno de ciertas toxinas secretadas por el hospedador (Pezet *et al.*, 1992).

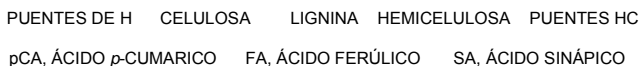
En plantas, las lacasas están implicadas en la respuesta primaria a heridas. El látex secretado polimeriza en una reacción dependiente de lacasa, formándose una película protectora que podría favorecer la curación (Davies *et al.*, 2001). En los tejidos leñosos, las lacasas intervendrían en la polimerización de la lignina (Bao *et al.*, 1993; Ranocha *et al.*, 1999).

También se han descrito fenoloxidasas, que muestran propiedades lacasa, en cutículas de larvas e insectos y que participarían en la esclerotización de las mismas (Gianfreda *et al.*, 1999).

1.1.6. BIODegradación DE LA LIGNINA

La lignina es el segundo componente más abundante de la biomasa vegetal, dónde desempeña un papel estructural. Actúa como pegamento entre las fibras de la madera, aportando sostén a los tejidos leñosos, y forma una matriz que rodea a las cadenas de celulosa (y hemicelulosa) en la pared secundaria de las plantas superiores, protegiéndolas de la degradación microbiana (Figura 1.4). Se trata de un polímero aromático formado por tres tipos de unidades fenilpropano, derivadas de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos: *p*-cumarílico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi, 3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamílico) que están unidas predominantemente por enlaces éter (β -O-4) y también por diferentes tipos de enlace C-C, lo cual confiere a la lignina una gran heterogeneidad y gran resistencia a la degradación (Hammel, 1997).

Debido a la importancia que la biodegradación de lignina tiene en el ciclo global del carbono en la naturaleza, y al interés del uso de los materiales lignocelulósicos como fuentes renovables de materiales, compuestos químicos y energía, este proceso ha sido objeto de investigación creciente desde hace décadas.



biodegradación de la lignina (Schoemaker *et al.*, 1991), seguido de otros hongos como *T. versicolor*, *Phlebia radiata* y *Pleurotus ostreatus*.

La biodegradación de lignina es un proceso oxidativo enzimático y radicalario. En él intervienen las enzimas oxidorreductasas ligninolíticas propiamente dichas (lacasas y peroxidasas) y variedad de enzimas auxiliares (oxidasas productoras de H_2O_2 , celobiosa deshidrogenasa, reductasas miceliares, etc) así como radicales generados durante el proceso. Entre estos últimos se incluyen especies activas de oxígeno, iones de metales oxidados y radicales de compuestos de bajo peso molecular liberados durante la degradación del polímero, que son capaces de atacar la lignina de forma no específica y penetrar en la pared celular, accediendo a zonas donde, por impedimentos estéricos, las enzimas no pueden acceder (Kawai *et al.*, 1989; Evans *et al.*, 1994; Guillén *et al.*, 2000; Camarero *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2005; Gorbacheva *et al.*, 2009).

La primera peroxidasa ligninolítica identificada fue la lignina peroxidasa (LiP) que es capaz de oxidar las unidades no fenólicas de la lignina (que representan hasta un 90 % del contenido total del polímero) (Tien *et al.*, 1983; Glenn *et al.*, 1983). La manganoso peroxidada (MnP), requiere Mn^{2+} para cerrar su ciclo activo, y es el Mn^{3+} quelado el que actúa como agente difusible oxidando las unidades fenólicas (Kuwahara *et al.*, 1984) y también las no fenólicas a través de reacciones de peroxidación de lípidos (Jensen *et al.*, 1996). La peroxidasa versátil (VP) descrita por primera vez en *Pleurotus eryngii* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999; Camarero *et al.*, 1999), combina las propiedades catalíticas de las dos enzimas anteriores, ya que oxida eficientemente compuestos no fenólicos de alto potencial redox como el alcohol veratrílico (LiP) o Mn^{2+} (MnP) (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009). Además, oxida fenoles en ausencia de Mn^{2+} . El H_2O_2 requerido por las peroxidasas ligninolíticas es producido por oxidasas como la glioxal oxidasa y la aril-alcohol oxidasa (Glenn *et al.*, 1983; Kersten *et al.*, 1987; Guillén *et al.*, 1994).

Las lacasas catalizan la oxidación de las unidades fenólicas de la lignina liberando H_2O al utilizar el O_2 como aceptor final de electrones (Thurston, 1994). Las lacasas fueron las primeras enzimas ligninolíticas estudiadas, si bien, su estudio quedó relegado a un segundo plano durante años debido a su relativamente bajo potencial redox. Sin embargo, su importancia en el proceso de deslignificación se manifiesta por su presencia en la práctica totalidad de los hongos ligninolíticos. Es más, algunos de estos hongos como *P. cinnabarinus* o *Coriolopsis rigida* sólo producen lacasa como única

enzima ligninolítica (Eggert *et al.*, 1996b; Saparrat *et al.*, 2002), sugiriendo la existencia de mecanismos no enzimáticos iniciados por estas enzimas en el proceso biodegradativo (Glenn *et al.*, 1983; Muñoz *et al.*, 1997; Saparrat *et al.*, 2001; Camarero *et al.*, 2005; Nikitina *et al.*, 2005).

1.2. SISTEMA LACASA-MEDIADOR

Las lacasas fúngicas son enzimas con elevado potencial biotecnológico en diferentes aplicaciones industriales gracias a su amplia especificidad de sustrato y al empleo de oxígeno como aceptor de electrones (en lugar del H_2O_2 utilizado por las peroxididasas). Sin embargo, poseen un E^0 máximo de 0,8 V, inferior al de las peroxididasas ligninolíticas (mayor de 1 V), limitando su rango de acción a compuestos aromáticos de bajo E^0 como las unidades fenólicas de la lignina (Kawai *et al.*, 1987).

Sin embargo, en presencia de ciertos compuestos de bajo peso molecular que actúan como intermediarios redox, denominados mediadores, la actividad catalítica de las lacasas puede ser expandida hacia sustratos no fenólicos más difícilmente oxidables, en lo que se denomina el sistema lacasa-mediador (Figura 1.5). La descripción de los sistemas lacasa-mediador amplió enormemente la versatilidad de las lacasas para su aplicación biotecnológica orientada a la degradación de compuestos aromáticos recalcitrantes.

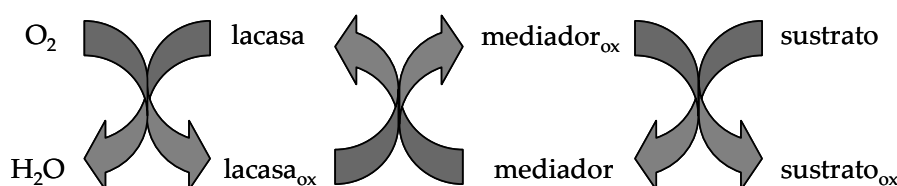


Figura 1.5. Ciclo redox del sistema lacasa-mediador.

Los mediadores constituyen un vehículo de transporte de electrones ya que, una vez oxidados por la enzima, y estabilizados en forma de radicales, difunden lejos del centro activo y, mediante mecanismos de oxidación diferentes del enzimático, oxidan sustratos que bien por su tamaño no pueden acceder al bolsillo enzimático, o que debido a su E^0 elevado no son, en principio, sustratos de la enzima (Kawai *et al.*, 1989; Bourbonnais *et al.*, 1990; Bourbonnais *et al.*, 1997b).

El mediador redox ideal debe ser un compuesto de bajo peso molecular, sustrato de la enzima, que forme radicales que no inactiven a la lacasa, sean suficientemente estables y capaces de reciclarse en sucesivos ciclos de óxido-reducción sin degradarse. Además, desde el punto de su aplicación industrial y medioambiental, los mediadores deberían ser compuestos de bajo coste, no tóxicos y de fácil biodegradación.

El primer mediador de lacasa utilizado en la oxidación de alcohol veratrílico y dímeros modelo de lignina no fenólicos fue el ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)) (Bourbonnais *et al.*, 1990). El primer paso en su oxidación lleva a la formación del radical catiónico (ABTS^{•+}), el cual es oxidado posteriormente al dicatión (ABTS²⁺), que es el responsable último de la oxidación de lignina utilizando una vía de transferencia electrónica (vía ET) (Figura 1.6). Posteriormente se ha demostrado la implicación del radical monocatiónico del ABTS^{•+} en la degradación de varios colorantes orgánicos (Solis-Oba *et al.*, 2005).

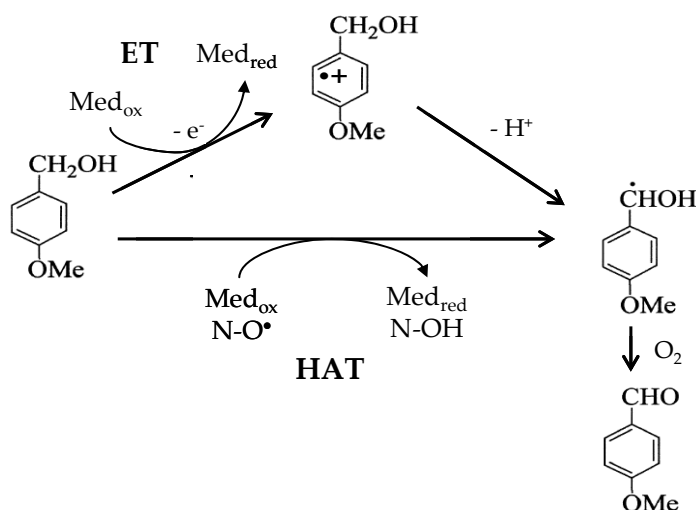


Figura 1.6. Oxidación de un compuesto modelo de lignina no fenólico (alcohol *p*-anisílico) por lacasa-mediador mediante dos mecanismos diferentes: ET (transferencia electrónica) y HAT (transferencia de un átomo de hidrógeno).

Un gran número de estudios posteriores se ha centrado en la búsqueda de nuevos mediadores sintéticos y en la elucidación de sus mecanismos de actuación. Hasta la fecha los más eficaces han resultado ser compuestos que portan un grupo N-OH como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), la N-hidroxiftalimida (HPI), el ácido violúrico (VA) o la N-hidroxiacetanilida (NHA) (Figura 1.7). La oxidación de estos mediadores por la lacasa genera un radical nitroxilo (N-O^\bullet), que es la especie activa del mediador, y que

actúa sustrayendo un átomo de hidrógeno del sustrato (vía HAT) (Figura 1.6) (Kawai *et al.*, 1989; Bourbonnais *et al.*, 1997a; Xu *et al.*, 2000; Fabbrini *et al.*, 2002). En el caso del mediador TEMPO, aunque también es de tipo N-OH, su mecanismo de actuación es de tipo iónico, no radicalario. Se presenta en disolución en forma de radical nitroxilo estable, siendo posteriormente oxidado por la lacasa para producir un ión oxoamonio que oxida el sustrato por una ruta de transferencia de electrones, extrayendo en primer lugar, un electrón y liberándose posteriormente el protón (Fabbrini *et al.*, 2002).

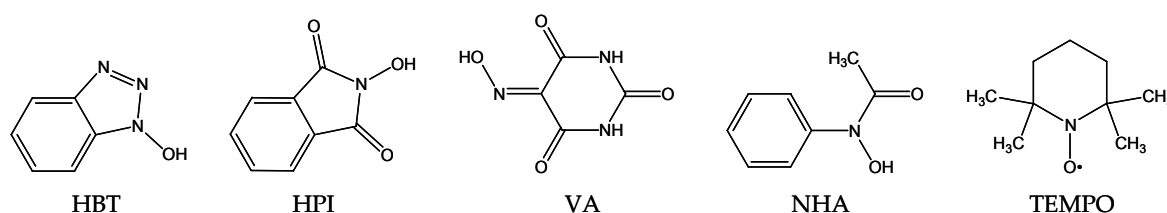


Figura 1.7. Estructura de algunos mediadores artificiales de lacasa de tipo N-OH.

Otros tipos de compuestos orgánicos también se han empleado como mediadores de lacasa en la oxidación de compuestos modelo de lignina, pasta kraft o colorantes textiles. Entre ellos se encuentran compuestos nitrosos y fenotiazinas como por ejemplo la promazina, el ácido propiónico-fenotiazina o el ácido 2-nitro-1-naftol-4-sulfónico (Bourbonnais *et al.*, 1997a; Camarero *et al.*, 2005).

Por otro lado, iones metálicos como el Mn^{2+} pueden actuar como mediadores de lacasa al ser oxidados por la enzima a Mn^{3+} (Muñoz *et al.*, 1997; Nikitina *et al.*, 2005). Recientemente, complejos metálicos llamados polioxometalatos han sido descritos como mediadores de lacasa en la degradación de la lignina (Gamelas *et al.*, 2005; Gamelas *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la combinación de dos o más mediadores (por ejemplo, ABTS y HBT) puede producir un efecto sinérgico en la actividad oxidativa de compuestos aromáticos recalcitrantes (Pickard *et al.*, 1999; Jeon *et al.*, 2008).

1.3. MEDIADORES DE LACASA DE ORIGEN NATURAL

A pesar de todas las ventajas asociadas al sistema lacasa-mediador, existen aspectos que limitan su aplicación. Entre ellos se encuentran el elevado coste económico de los mediadores de origen sintético, la posible generación de derivados tóxicos (y la carencia de estudios suficientes sobre los efectos de éstos), la inactivación de la enzima por los radicales de algunos mediadores o la degradación del mediador a especies inactivas (como por ejemplo benzotriazol a partir del HBT).

Por todo ello, los estudios más recientes se han focalizado en la búsqueda de mediadores alternativos de bajo coste y respetuosos con el medioambiente. El empleo de mediadores de origen natural presentaría, en principio, ventajas medioambientales y económicas.

El **ácido 3-hidroxiantranílico**, un metabolito secundario sintetizado por *P. cinnabarinus*, fue el primer compuesto de origen natural descrito como mediador en la oxidación de sustratos no fenólicos y lignina sintética por la lacasa de *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1996a). Este trabajo supuso una de las primeras evidencias de la implicación de mediadores redox de origen natural en la biodegradación del polímero de lignina. Estudios posteriores pusieron en entredicho el papel de este metabolito en la degradación de la lignina, demostrando que el acoplamiento oxidativo de sus radicales, tras ser oxidado por la lacasa, producía ácido cinnabarínico, el cual no poseía actividad frente a sustratos no fenólicos al no poseer ningún grupo susceptible de ser oxidado a radical fenoxilo (Li *et al.*, 2001). Este metabolito se incluyó en estudios posteriores de degradación de compuestos aromáticos por lacasa no resultando activo como mediador (Johannes *et al.*, 2000).

Johannes y colaboradores lograron la oxidación enzimática de varios hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) mediada por sustratos de lacasa y por compuestos producidos y secretados por el hongo *T. versicolor*. Los mejores mediadores naturales fueron **ácido 4-hidroxibenzoico**, anilina, fenol y alcohol 4-hidroxibencílico. En el mismo trabajo se describió el efecto positivo del grupo -SH de los aminoácidos y ciertos compuestos naturales como el glutatión reducido para actuar como mediadores de lacasa (Johannes *et al.*, 2000). El ácido 4-hidroxibenzoico también actuó como mediador eficaz en la degradación y reducción de la toxicidad de un fungicida (Maruyama *et al.*, 2007). En general, las concentraciones de

mediador empleadas en estos estudios fueron muy elevadas, con relaciones mediador/PAH de incluso 200. Estas concentraciones implican condiciones diferentes a las que se dan en la naturaleza, pudiéndose producir otras rutas de oxidación que darían lugar a metabolitos desconocidos (Cantarella *et al.*, 2003; Branchi *et al.*, 2005).

El **rojo fenol**, también de naturaleza fenólica, fue utilizado como mediador en la oxidación del alcohol *p*-anisílico, a pesar de su lenta oxidación por la lacasa. Los niveles de degradación obtenidos fueron elevados y superiores a los alcanzados con ácido 3-hidroxiantranílico o con HBT (d'Acunzo *et al.*, 2003; Cantarella *et al.*, 2003). Pese a no ser un buen sustrato de la enzima, el hecho de formar radicales fenoxilo de “larga vida” y la formación de especies secundarias que pueden actuar también como mediadores (debido a la existencia de grupos fenoxilo adicionales) fueron factores que determinaron la viabilidad y eficacia del rojo fenol como mediador de la lacasa.

Recientemente se ha descrito la capacidad de ciertos compuestos fenólicos de origen natural, liberados durante la biodegradación de la lignina, para actuar como mediadores redox de lacasa (Camarero *et al.*, 2005). Estos **compuestos fenólicos relacionados con la lignina** tales como acetosiringona, siringaldehído o vainillina promueven eficazmente la actividad enzimática en la decoloración de tintes industriales, el blanqueamiento de pastas de papel y o la degradación de lípidos responsables de los depósitos de *pitch* en pastas de papel (Camarero *et al.*, 2005; Camarero *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2007).

El mecanismo catalítico de oxidación de un fenol por la lacasa es muy similar a la oxidación de los mediadores artificiales de tipo N-OH. Ambos dependen de la diferencia de E^0 entre el cobre T1 de la lacasa y el mediador, diferencia en la que influye significativamente el pH del medio. Los E^0 de los compuestos N-OH, igual que ocurre con los fenoles, se reducen a medida que se incrementa el pH del medio, incrementando por tanto su oxidación por la lacasa (Xu, 1997; Xu *et al.*, 2000). Por su parte, los radicales de algunos mediadores artificiales de tipo N-OH causan la inactivación de la lacasa (Amann, 1997; Freudenberg *et al.*, 1998). Sin embargo, ciertos compuestos fenólicos, sustratos de la enzima, son capaces de aumentar la estabilidad de la misma, debido a la unión del fenol al sitio activo de la enzima o a otro lugar de la cadena proteica (Mai *et al.*, 2000).

1.4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LACASAS Y SISTEMAS LACASA-MEDIADOR

La descripción del sistema lacasa-mediador, que elimina la limitación de las lacasas de oxidar solamente compuestos fenólicos de bajo potencial redox, junto con la amplia especificidad de sustrato de las lacasas y el hecho de que el aceptor final de electrones sea el oxígeno, confieren a estas enzimas unas características idóneas para su utilización en diferentes aplicaciones biotecnológicas. La eficacia y versatilidad de los sistemas lacasa-mediador ha sido de hecho profusamente demostrada en numerosos estudios de degradación de compuestos recalcitrantes, si bien no se ha llegado a su aplicación industrial salvo en casos puntuales. El empleo de nuevos mediadores de origen natural, que superen las limitaciones económicas y medioambientales de los mediadores artificiales de origen sintético, puede suponer un importante avance hacia la implementación de las lacasas en diversas aplicaciones a escala industrial.

1.4.1. APLICACIONES INDUSTRIALES

1.4.1.1. Industria papelera

La fabricación industrial de papel requiere la separación y degradación de la lignina, de la celulosa que integra las pastas. Tradicionalmente en dicho proceso, la etapa de blanqueo de la pasta de papel es la que genera mayor impacto ambiental, debido al empleo de reactivos químicos clorados que generan organoclorados muy tóxicos. Las mayores restricciones legales han promovido el desarrollo de secuencias de blanqueo libres de cloro elemental (ECF), y totalmente libres de cloro (TCF) basadas en la deslignificación con oxígeno, ozono y peróxido de hidrógeno. En este contexto, la integración de etapas enzimáticas con lacasa-mediador, puede aportar una estrategia limpia y efectiva para la deslignificación y blanqueo de pastas de papel (Bourbonnais *et al.*, 1992; Bajpai *et al.*, 2006).

El sistema lacasa-HBT ha resultado especialmente eficaz en el blanqueo y deslignificación de pastas de fibras leñosas y no leñosas, aumentando el rendimiento de las secuencias de blanqueo industriales TCF no contaminantes, consiguiendo valores de blancura y lignina residual muy difíciles de alcanzar sólo con reactivos químicos (García *et al.*, 2003;

Camarero *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2006a). Del mismo modo se ha demostrado la eficacia del sistema lacasa-HBT para eliminar los depósitos de *pitch* formados principalmente por lípidos, que representan un gran problema en la industria papelera, disminuyendo la calidad del papel e incrementando los gastos de producción (Camarero *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2006). El empleo de mediadores de origen natural como acetosiringona y siringaldehído en la deslignificación y blanqueo de pasta de papel y en la eliminación de depósitos de *pitch*, ha reportado datos similares a los obtenidos con el mediador artificial HBT (Camarero *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2007).

Por otro lado, la recuperación de fibras secundarias de periódicos u otros materiales requiere eliminar las tintas. Convencionalmente en el destintado de las fibras recicladas se han empleado procesos mecánicos, térmicos y químicos, pero existen trabajos que demuestran la capacidad del sistema lacasa-mediador para la eliminación de colorantes en papel amarillo (Xu *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007).

1.4.1.2. Fabricación de tableros y productos con nuevas propiedades

La capacidad de la lacasas de oxidar fenoles de la lignina y formar radicales reactivos puede ser empleada para introducir modificaciones puntuales en fibras de lignocelulosa. Así, pueden emplearse en la adhesión enzimática de fibras de madera para la fabricación de tableros con mayor resistencia mecánica y sin necesidad de usar adhesivos sintéticos tóxicos derivados del formaldehído (Hüttermann *et al.*, 1989; Felby *et al.*, 1997). Otra posibilidad es la funcionalización de fibras de celulosa por lacasa para modificar las propiedades químicas (mayor o menor hidrofobicidad), físicas (resistencia mecánica), ópticas o incluso antibacterianas de los productos finales. En este sentido, varios estudios han demostrado la posibilidad de “introducir” o “injertar” nuevos grupos funcionales en las fibras de pasta kraft mediante su funcionalización con derivados fenólicos (Felby *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 2001; Chandra *et al.*, 2002). También se pueden sintetizar polímeros naturales o mixtos, a través de la polimerización de fenoles por el sistema lacasa-mediador (Yamaguchi *et al.*, 1992).

1.4.1.3. Industria alimentaria

Las lacasas participan en la estabilización y en el incremento de la calidad de diferentes bebidas, mediante la eliminación de fenoles indeseables,

responsables de la turbidez y oscurecimiento de zumos de frutas, cerveza y vino, y en general aumentando las propiedades organolépticas de estos productos (Felby *et al.*, 1997; Minussi *et al.*, 2002).

1.4.1.4. Industria cosmética

Los productos utilizados habitualmente para el aclarado o tinte del cabello contienen reactivos químicos fuertes que pueden dañar el pelo. Una alternativa menos dañina podría ser el empleo de lacasas en presencia de estilbenos (Onuki *et al.*, 2000). Por otro lado, pigmentos empleados en esta industria, como melaninas, se pueden producir a través de reacciones oxidativas catalizadas por lacasa (Nagai *et al.*, 2003; Tetsch *et al.*, 2005).

1.4.1.5. Industria textil

Una de las aplicaciones de estas enzimas con mayor proyección a escala industrial es su empleo en el blanqueo de fibras de algodón y colorantes textiles, como el índigo en prendas vaqueras (Riva, 2006), existiendo preparaciones comerciales de lacasa y mediador como DeniLite® (Novozymes, Dinamarca).

1.4.1.6. Nanobiotecnología

El fenómeno de la transferencia directa de electrones desde un electrodo a la molécula de lacasa (bioelectrocatalisis) se ha empleado para la creación de cátodos en biopilas de combustible y biosensores. La modificación del cátodo con lacasa incrementa la velocidad de transferencia electrónica y supone una alternativa limpia al uso de platino (metal caro y escaso), generando una energía eléctrica sin combustión (Barton *et al.*, 2001).

Se han desarrollado biosensores basados en lacasas para el análisis de diferentes compuestos fenólicos (Freire *et al.*, 2001), oxígeno, azidas, narcóticos (Bauer *et al.*, 1999), pesticidas (Zherdev *et al.*, 1999) o para electroinmunoensayos (Kuznetsov *et al.*, 2001).

1.4.1.7. Síntesis orgánica

Las lacasas también se emplean en síntesis orgánica, por ejemplo para la oxidación de grupos hidroxilo de derivados de azúcares, la producción de polímeros complejos (p.ej policatecol para resinas de cromatografía) o la síntesis de agentes farmacológicos (antitumorales, nuevos derivados de

antibióticos o antioxidantes) (Abadulla *et al.*, 2000; Mai *et al.*, 2002; Marzorati *et al.*, 2005; Uyama *et al.*, 2006; Baratto *et al.*, 2006; Kunamneni *et al.*, 2008).

Las lacasas se han empleado en la producción de colorantes (Baker *et al.*, 1996). Recientemente se han sintetizado colorantes fenólicos empleando una lacasa industrial (Suberasa® de Novozymes).

1.4.2. PROCESOS DE DESCONTAMINACIÓN Y DETOXIFICACIÓN

La amplia especificidad de sustrato de las lacasas y el elevado potencial oxidativo del sistema lacasa-mediador ha dirigido su estudio hacia la degradación de compuestos aromáticos problemáticos para el medioambiente, entre los que se encuentran colorantes textiles, bifenilos policlorados (PCBs), clorofenoles, fitosanitarios o hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Johannes *et al.*, 1998; Nyanhongo *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2004; Keum *et al.*, 2004).

Los **PAHs** son un grupo de contaminantes ubicuos en ambientes terrestres y acuáticos y altamente tóxicos (Bumpus, 1989). Su toxicidad aumenta a medida que se reduce su solubilidad en agua y está determinada por el número de anillos de su estructura química y la angularidad de los mismos. El benzo[a]pireno es un PAH clasificado por la EPA como contaminante prioritario debido a su persistencia, carcinogenicidad y alto factor de bioacumulación y biomagnificación a través de la cadena trófica (Kanaly *et al.*, 2000). Las fuentes de emisión de PAHs incluyen las combustiones antropogénicas de combustibles fósiles y los incendios forestales, entre otras (Cerniglia, 1992).

Bacterias, algas y hongos son capaces de degradar estos compuestos a través del ataque enzimático del anillo, en presencia de oxígeno molecular. Las bacterias y algunas algas, utilizan dioxigenasas generando *cis*-dihidrodióles que son posteriormente degradados a catecoles por deshidrogenasas y finalmente metabolizados. La oxidación de PAH por las citocromo P-450 monooxigenasas de hongos, bacterias y algas da lugar a epóxidos cuya activación en vertebrados genera *trans*-dihidrodióles que son carcinógenos debido a su capacidad de unirse al ADN, induciendo sustituciones, inserciones y deleciones de bases u otros tipos de alteraciones genéticas, como se ha demostrado con el benzo[a]pireno (Shugart *et al.*, 1988; Hanrahan *et al.*, 1997; Castaño *et al.*, 2004). En los

hongos ligninolíticos la presencia de lacasas y peroxidasas permite la oxidación de PAH a quinonas, de menor toxicidad que el PAH de partida (Torres *et al.*, 2003; Cañas *et al.*, 2006) como paso intermedio a la posterior mineralización total (Figura 1.8) (Haemmerli *et al.*, 1986; Cerniglia, 1992).

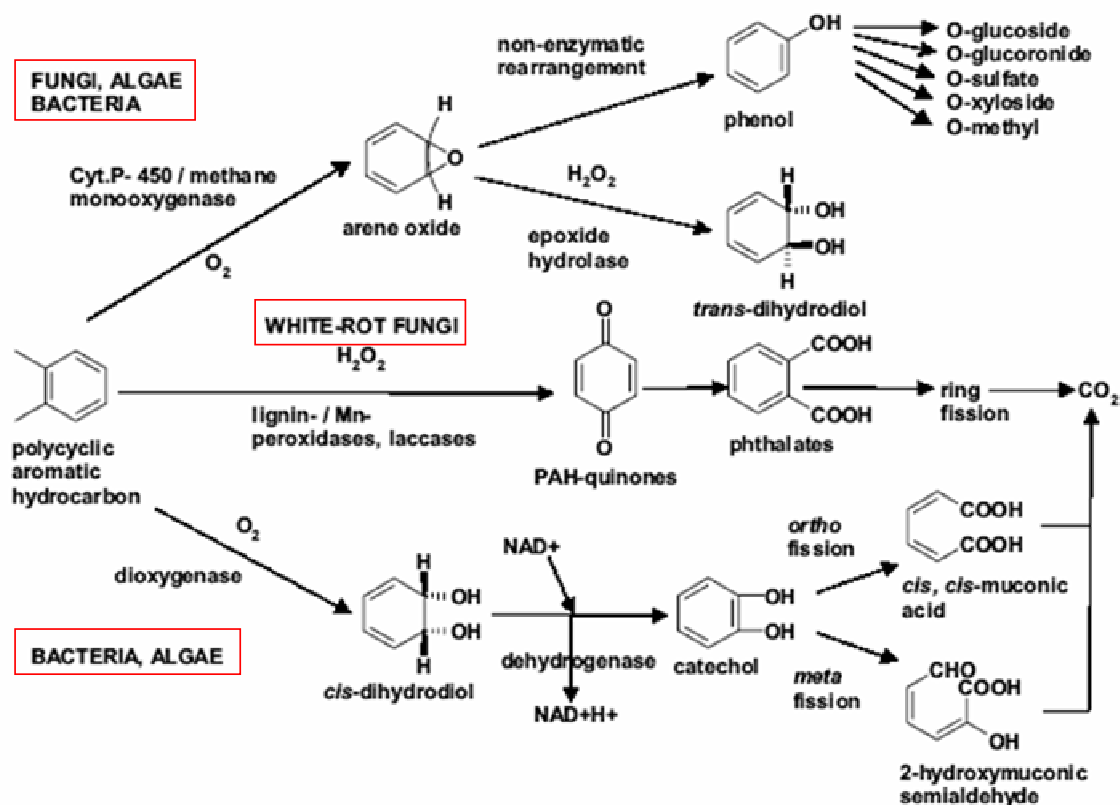


Figura 1.8. Diferentes rutas de biodegradación de PAHs (Cerniglia, 1992).

Las lacasas por sí solas pueden oxidar determinados PAHs de bajo peso molecular y en presencia de mediadores pueden aumentar su porcentaje de degradación e incluso degradar otros PAHs más recalcitrantes como el benzo[a]pireno (Collins *et al.*, 1996; Johannes *et al.*, 1996; Majcherczyk *et al.*, 1998; Majcherczyk *et al.*, 2000; Alcalde *et al.*, 2002).

Otros contaminantes muy tóxicos y problemáticos debido a su abundancia y persistencia son los **fitosanitarios**. Estos compuestos no pueden ser degradados de forma no enzimática debido a su estructura orgánica sintética que porta, entre otros, átomos de cloro, fósforo o azufre (Jauregui *et al.*, 2003). Algunos de estos pesticidas han sido degradados por la lacasa en presencia de ABTS (Amitai *et al.*, 1998) o el fungicida ciprodinil, en presencia de compuestos fenólicos de origen natural, siendo el siringaldehído el más eficaz (Kang *et al.*, 2002).

La elevada capacidad de las lacasas y sistemas lacasa-mediador para oxidar un amplio rango de compuestos químicos recalcitrantes de variada naturaleza ha dirigido su aplicación al **tratamiento de efluentes industriales** donde abundan mezclas de compuestos muy diversos. Los efluentes de la industria papelera son ricos en fenoles provenientes del pasteo y blanqueo de las pastas, principalmente derivados de la lignina, que aportan el característico color oscuro, así como clorofenoles, y extraíbles lipofílicos. Estos compuestos deben ser eliminados antes de la reutilización de las aguas en el proceso o de su vertido al medio, pudiendo emplear las lacasas y los sistemas lacasa-mediador para ello.

Los efluentes de destilerías, fábricas de cerveza y fábricas de aceite también contienen muchos polifenoles que aportan color. El tratamiento de estos efluentes con lacasa resultaría en la oxidación de estos polifenoles tóxicos con la consiguiente polimerización y formación de productos insolubles, permitiendo la separación del precipitado.

La industria textil genera grandes cantidades de **tintes orgánicos sintéticos** en sus efluentes que suponen una importante fuente de contaminación ambiental ya que aportan grandes dosis de color. Debido a la gran variedad de estructuras químicas y a su complejidad, los tratamientos biológicos y físico-químicos convencionales no son muy eficaces. Atendiendo a su estructura, existen tres tipos principales de tintes; azo, ftalocianina y antraquinona (Hao *et al.*, 2000). Estos compuestos contienen grupos nitro y sulfónico como sustituyentes, lo cual impide la decoloración en procesos aeróbicos convencionales. Además, el 50 % de estos tintes son de tipo azo, pudiéndose transformar en compuestos carcinogénicos (aminas aromáticas) en condiciones anaerobias. Las lacasas y en extensión, el sistema lacasa-mediador, se plantean como una solución de descontaminación alternativa para este tipo de efluentes ya que son capaces de decolorar colorantes de un amplio rango de estructuras químicas con muy buenos resultados (Abadulla *et al.*, 2000; Blánquez *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2004), incluso en presencia de mediadores naturales (Campos *et al.*, 2001; Camarero *et al.*, 2005).

1.5. DISEÑO DE ENZIMAS POR EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA

Muchas enzimas comparten ancestros comunes y han evolucionado adquiriendo diferentes propiedades en función del azar y la selección natural para desarrollar funciones metabólicas muy específicas en contextos celulares determinados (Affholter *et al.*, 1999).

Las enzimas, en su papel como biocatalizadores, presentan ventajas sustanciales con respecto a los catalizadores químicos tradicionales utilizados a nivel industrial, ya que derivan de fuentes renovables y son biodegradables, presentando por tanto un impacto medioambiental muy reducido, y ofreciendo además, gran selectividad y pureza de productos (Cherry *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar del elevado atractivo de las enzimas para las aplicaciones biotecnológicas, todavía presentan muchos inconvenientes. Entre ellos se encuentran la lenta catálisis frente a sustratos no-naturales, la baja estabilidad o poca tolerancia a cambios en los parámetros operativos, la poca actividad en medios no acuosos y, en algunos casos, el requerimiento de cofactores caros (Farinas *et al.*, 2001). El reciente progreso en las técnicas de manipulación genética, tecnologías *high-throughput*, genómica y proteómica ha permitido el desarrollo de nuevos biocatalizadores que superan las limitaciones expuestas anteriormente, permitiendo su implementación exitosa en procesos industriales y biotecnológicos.

La herramienta utilizada tradicionalmente para mejorar las propiedades de una enzima ha sido el diseño racional, incluyendo la llamada mutagénesis dirigida, donde se realizan cambios precisos en la secuencia de aminoácidos basados en el detallado conocimiento de la estructura, función y mecanismo proteicos. A pesar del desarrollo de las técnicas de cristalografía de rayos X o espectroscopia de RMN de proteínas, y del aumento del número de secuencias almacenadas en bases de datos públicas, todavía se escapa al conocimiento científico cómo la estructura tridimensional de una proteína puede determinar la reacción que va a catalizar. La estructura y secuencia de la enzima también determinan su sensibilidad a la temperatura, la interacción con otras moléculas que pueden activarla o inactivarla, su estabilidad en diferentes disolventes y otras muchas propiedades. Por otro lado, las enzimas son entidades dinámicas en constante movimiento conformacional, existiendo diversas fuerzas que

estabilizan la estructura tridimensional, y también otras muchas que la desestabilizan, por lo tanto, la estructura cristalográfica de una proteína representa un momento determinado dentro de la complicada cinética enzimática. A pesar de décadas de intensa investigación sobre relaciones estructura-función de proteínas, todavía nos encontramos muy lejos de poder diseñar cualquier enzima de forma racional (Arnold *et al.*, 1999), necesitando, por tanto estrategias alternativas.

Un siglo y medio después de que Darwin expusiese su teoría de la evolución, sus ideas no sólo siguen vigentes, sino que han servido además, de inspiración y modelo para uno de los principales desarrollos biotecnológicos desde el descubrimiento de la ingeniería genética, la aparición de la evolución molecular dirigida. Surgió a principios de los años 90 como una herramienta novedosa y efectiva para la mejora de enzimas en el laboratorio en ausencia de suficiente información estructural o funcional. La teoría de la evolución a través de la selección natural propugna la adaptación de los seres vivos al entorno mediante cambios aleatorios minúsculos y heredables de generación en generación (Darwin, 1859). En el laboratorio, se puede simular un particular escenario evolutivo mediante presiones selectivas específicas, recreando los procesos claves de la evolución, - mutación, recombinación y selección -, y condensando en meses, los millones de años en que se mueve la escala temporal de la evolución.

En la evolución *in vitro*, se utilizan técnicas de mutagénesis aleatoria inducida y/o recombinaciones en el material genético, de manera que, a partir de un gen que codifica para una proteína, se crea una diversidad genética que se expresa en un hospedador. Esta diversidad, representada en una librería de variantes, se explora con tecnologías *high-throughput* bajo las condiciones adecuadas para identificar las mejoras de la función deseada o propiedad (Williams *et al.*, 2004). De esta manera, sometiendo los genes seleccionados a ciclos sucesivos de mutación/recombinación y *screening*, las diferentes mutaciones puntuales beneficiosas se irán acumulando y combinando hasta adquirir la propiedad deseada, que se ve mejorada, generación tras generación (Figura 1.9) (Arnold *et al.*, 1999).

El principio de la evolución dirigida a nivel molecular fue demostrado por primera vez con ácidos nucleicos (Mills *et al.*, 1967), y posteriormente se aplicó para la ingeniería de proteínas (Arnold, 1988). Las técnicas de recombinación o barajado de ADN (*DNA shuffling*) (Stemmer, 1994), que

acelera el proceso evolutivo permitiendo acumular mutaciones beneficiosas y eliminar las deletéreas, promueven el rápido crecimiento de la evolución molecular dirigida. Este conjunto de técnicas no sólo permite crear nuevas proteínas funcionales sino también ensayar características fundamentales de la estructura-función de una proteína.

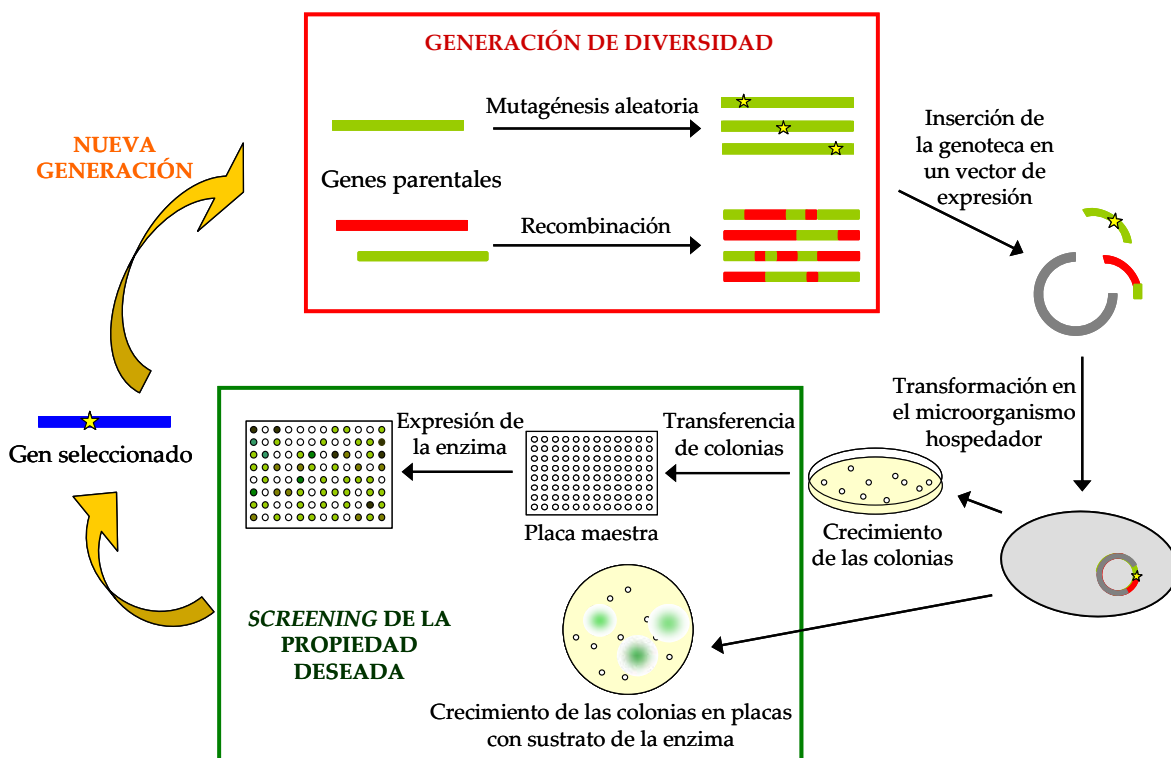


Figura 1.9. Esquema general de un experimento de Evolución Molecular Dirigida

Muchas de las mutaciones introducidas por evolución molecular dirigida se encuentran en la superficie de la proteína, lejos del centro activo, de manera que sus pequeñas contribuciones a la actividad total son muy difíciles de predecir y explicar. La inherente complejidad de las proteínas y la importancia de evolucionar el gen entero, en lugar de unos cuantos residuos limitados, subrayan la utilidad del diseño no racional mediante evolución dirigida (Arnold, 1998). En los casos en los que se conoce la estructura proteica, la evolución dirigida ha permitido la combinación de mutaciones que no habrían sido deducidas de comparaciones filogenéticas o de análisis estructurales (Martin *et al.*, 2001). Sin embargo, las estrategias que dirigen la mutagénesis a regiones particulares de una proteína pueden complementar la mutagénesis aleatoria de todo el gen y preparar el camino para conseguir objetivos de ingeniería de enzimas más ambiciosos. La combinación del diseño racional y no racional representa probablemente el

acercamiento más poderoso para el desarrollo de nuevos biocatalizadores en el futuro (Zhao *et al.*, 2002).

Mediante técnicas de evolución molecular dirigida se pueden modificar muchas de las propiedades que aportan las características intrínsecas de una proteína. Es posible invertir la enantioselectividad (May *et al.*, 2000), cambiar la especificidad de sustrato (Iffland *et al.*, 2000) o modificar la regioespecificidad (Chen *et al.*, 2008). Eligiendo métodos de *screening* adecuados, pueden incrementarse otras propiedades, incluso de forma simultánea, como la actividad de una enzima o su estabilidad frente a disolventes orgánicos (Zumarraga *et al.*, 2007), temperatura (Mordukhova *et al.*, 2008) o pH alcalino (Lin *et al.*, 2009), entre otras. Además, mediante esta técnica también se pueden crear actividades o especificidades nuevas (Raillard *et al.*, 2001), o aumentar la expresión génica de una determinada proteína en un hospedador (Bulter *et al.*, 2003b). En los últimos años, la evolución *in vitro* se ha extendido desde las proteínas a rutas metabólicas, virus y genomas enteros (Zhao *et al.*, 2002).

Durante los últimos años se han desarrollado herramientas computacionales que simulan los procesos de generación de diversidad génica y navegan en las relaciones secuencia-función y estructura-función de las proteínas. Estos métodos podrían asistir a los científicos en el diseño de librerías de mutantes de alta calidad, focalizando la generación de diversidad en la dirección más adecuada y permitiendo la selección de proteínas prometedoras como punto de partida para evolución dirigida. Estas herramientas permitirían también identificar sitios en la proteína susceptibles de ser mutados, posibilitando la sustitución por todos los aminoácidos posibles mediante mutagénesis saturada y la identificación de múltiples mutaciones con efectos sinérgicos (Farinas *et al.*, 2001).

1.5.1. *Saccharomyces cerevisiae* COMO HUÉSPED HETERÓLOGO EN ENSAYOS DE EVOLUCIÓN DIRIGIDA

El primer paso en un experimento de evolución dirigida es conseguir la expresión funcional del gen de interés en un huésped adecuado. Considerando la eficiencia de transformación, la estabilidad de los plásmidos, el detallado conocimiento de su genoma y su rápido crecimiento, *Escherichia coli* y *S. cerevisiae* han sido los huéspedes más utilizados para estos experimentos (Bulter *et al.*, 2003a). La expresión

heteróloga de proteínas comenzó a realizarse en *E. coli*. Sin embargo, el diferente uso de codones y la existencia de mecanismos de transcripción, traducción y post-traducción que difieren de los eucariotas, generan bajos niveles de expresión de proteínas heterólogas que carecen de actividad biológica o son insolubles como consecuencia de un plegamiento inadecuado. Por este motivo, las levaduras están cobrando relevancia, al poseer un sistema de secreción similar al de eucariotas superiores (Kingsman *et al.*, 1985; Romanos *et al.*, 1992).

El uso de la levadura *S. cerevisiae* como huésped heterólogo es de gran interés dado que es de fácil manipulación, posee elevada eficiencia de transformación y es capaz de realizar las modificaciones post-traduccionales (procesamiento proteolítico y glicosilación) necesarias para secretar las proteínas de interés al medio extracelular, evitando pasos intermedios de lisis celular. Al mismo tiempo, secreta al medio pocas proteínas nativas, de manera que se minimizan las interferencias con la enzima de interés y se facilitan los procesos de purificación (Brake *et al.*, 1984). Además, haciendo uso de un vector episómico adecuado, no integra el plásmido dentro de su genoma, facilitando así su posterior manipulación genética. Su fácil manipulación unida a su elevada frecuencia de recombinación homóloga de ADN, convierten a *S. cerevisiae* en el modelo de organismo eucariota para estudios de recombinación homóloga de diferentes genes, (Bulter *et al.*, 2003a). Por otro lado, la ligación de genes mutantes en vectores de expresión es un paso crítico que habitualmente se realiza *in vitro*. La levadura posee un mecanismo reparador de huecos (*in vivo gap repair*) que permite sustituir la ligación *in vitro*, obteniendo *in vivo* vectores circulares de replicación autónoma sin las mutaciones adicionales que son habituales en los métodos tradicionales, acortando por tanto, el protocolo (Bulter *et al.*, 2003a).

La secreción de proteínas heterólogas en levaduras se ha incrementado en diversos estudios utilizando las secuencias señales de proteínas secretadas por la propia levadura (fosfatasa ácida, invertasa). La secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae* ha sido la más utilizada para dirigir la secreción de proteínas heterólogas en levaduras. El factor α es una feromona implicada en la unión de células haploides. Su secuencia señal completa, es decir, el pre-propéptido, es escindida durante la maduración y secreción de la proteína al medio extracelular, no formando parte, por lo tanto, de la proteína madura. Comprende 83 aminoácidos, de los cuales 19 constituyen el prepéptido y 64 el propéptido. El prepéptido es el responsable de la

inserción de la cadena polipeptídica en maduración en el retículo endoplasmático, tras lo cual es escindido por la acción de una endopeptidasa entre los aminoácidos 19 y 20. El propéptido interviene en el plegamiento de la cadena polipeptídica durante su transición y estancia del retículo endoplasmático al aparato de Golgi, donde es escindido antes de que la enzima madura sea secretada al exterior mediante la actuación de tres proteasas específicas (*KEX1*, *KEX2* y *STE13*) (Brake *et al.*, 1984).

1.5.2. CREACIÓN DE VARIABILIDAD GÉNICA

En los experimentos de evolución dirigida los procesos de mutación y recombinación sexual surgidos espontáneamente en la naturaleza son reemplazados por pasos controlados de mutagénesis aleatoria inducida y recombinación de ADN de los genes en estudio.

El tamaño de la genoteca generada (determinado por el ensayo de *screening*) y su calidad van a determinar el éxito en el diseño o mejora de una proteína mediante evolución molecular. Para obtener una librería adecuada hay que tener en cuenta fundamentalmente dos aspectos; la frecuencia de mutación y el tipo de mutaciones/recombinaciones introducidas. El hecho de que las mutaciones beneficiosas sean muy escasas, ya que la mayoría son deletéreas o neutrales, hace que el rango de mutaciones introducidas deba ajustarse cuidadosamente. Se considera un buen nivel mutacional, la sustitución de entre uno y tres aminoácidos por gen en cada ciclo evolutivo (Williams *et al.*, 2004). De esta manera, una única mutación que suponga una mejora de la proteína, se acumulará a través de ciclos iterativos de mutagénesis y selección en una estrategia evolutiva beneficiosa.

1.5.2.1. Mutagénesis aleatoria

La introducción de mutaciones durante el proceso de replicación del ADN se puede realizar por diversos métodos como el empleo de agentes químicos o físicos mutagénicos (agentes desaminantes o radiación UV), la utilización de cepas huéspedes “mutadoras” o “proteínas mutadoras”, el empleo de métodos basados en mutagénesis saturada (Wong *et al.*, 2006) Otra manera de crear diversidad molecular es la introducción de mutaciones mediante la delección y posterior inserción de un número arbitrario de bases consecutivas en posiciones al azar (Murakami *et al.*,

2002). Sin embargo, el método ideal para realizar mutagénesis aleatoria de un gen de interés además de ser simple, reproducible y económico, debe tener un espectro mutacional imparcial y una frecuencia de mutación controlable e independiente de la longitud del gen. Los métodos mutagénicos más ampliamente utilizados por cumplir los requisitos anteriores son los basados en reacciones enzimáticas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

La PCR propensa a error (*error-prone* PCR o epPCR) es un método simple, robusto y eficiente que permite el control fácil y preciso de los diferentes parámetros de la reacción. Para la generación de mutaciones se utilizan polimerasas que carecen de actividad correctora o que inducen la aparición de mutaciones bajo determinadas condiciones de reacción (Zhao *et al.*, 1999).

La frecuencia de mutación es uno de los factores más importantes a considerar para obtener resultados exitosos en un experimento de evolución dirigida. Para el estudio de la estructura-función de una proteína, una frecuencia de mutación que suponga la sustitución de un solo aminoácido por gen parece lo más deseable. Sin embargo, los ensayos de evolución molecular dirigida para mejorar propiedades enzimáticas, utilizan frecuencias mayores, induciendo entre uno y cuatro cambios aminoacídicos por gen en cada ciclo de evolución (Williams *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2006). Para tener un número suficiente de clones mutados activos, las frecuencias de mutación se ajustan empíricamente para obtener entre el 60 y 70 % de clones activos, o lo que es lo mismo, que el 30-40 % de los mutantes de la genoteca presenten menos del 10 % de la actividad del parental (Cirino *et al.*, 2003). El número de sustituciones aminoacídicas durante la reacción de epPCR puede incrementarse aumentando la concentración de Mg^{2+} relativa a la concentración total de dNTP, añadiendo concentraciones superiores a 5 mM de Mn^{2+} o usando dNTPs desbalanceados (Eckert *et al.*, 1990). Por otro lado, bajas concentraciones de ADN molde o mayor número de ciclos de PCR también resultan en mayores duplicaciones y consecuentemente en mayor tasa de mutación.

Conseguir una genoteca con cambios aminoacídicos equilibrados es otro de los factores clave para el éxito de un experimento de evolución dirigida. Además de la predisposición mutacional de cada polimerasa, hay que tener en cuenta la degeneración del código genético. El código genético está estructurado de manera que una única sustitución de un nucleótido en un codón causa predominantemente cambios entre aminoácidos con

propiedades muy similares, y sólo 5,6 aminoácidos de los 19 posibles serían accesibles con esta sustitución nucleotídica única (Zhao *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2004). Todos estos factores reducen significativamente la diversidad de los nucleótidos sustituidos y por lo tanto una amplia fracción del espacio proteico queda inexplorada.

1.5.2.2. Métodos de recombinación

La diversidad genética inducida por mutagénesis aleatoria puede ser ampliada mediante los métodos de recombinación de ADN, permitiendo la eliminación de mutaciones deletéreas o neutrales y la recombinación de las diferentes mutaciones beneficiosas que se acumularán en un único gen, expandiendo significativamente su diversidad de secuencia y acelerando el proceso evolutivo (Stemmer, 2002). Es importante señalar que las mutaciones naturales típicamente son el resultado de la recombinación sexual u homóloga que genera deleciones, inserciones, duplicaciones u fusiones (Chen, 2001), permitiendo también reparar los genes dañados.

En 1994 se describió el primer método de recombinación de ADN llamado *in vitro* DNA shuffling o barajado *in vitro* de ADN (Stemmer, 1994), basado en la fragmentación aleatoria de ADN mediante una DNAsa, seguida de una reacción de PCR en ausencia de oligonucleótidos cebadores dando lugar a secuencias recombinadas completas con nuevas combinaciones que se someten a un nuevo ciclo de PCR para su amplificación (Figura 1.10).

A partir de este método se han desarrollado otras muchas técnicas de recombinación *in vitro* de ADN como StEP (Staggered Extension Process) (Zhao *et al.*, 1998), RACHITT (Random Chimeragenesis on Transient Templates) (Coco *et al.*, 2001) o DOGS (Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling) (Gibbs *et al.*, 2001). Los métodos de DNA shuffling tradicionales requieren una homología de secuencia de al menos el 60 %. Sin embargo, también han surgido otros métodos que superan esta limitación como ITCHY (Incremental Truncation for The Creation of Hybrid enzymes) (Ostermeier *et al.*, 1999), SCRATCHY (combina ITCHY y DNA shuffling) (Lutz *et al.*, 2001), SHIPREC (Secuence Homology-Independent Protein Recombination) (Sieber *et al.*, 2001) e *in vivo* Exon Shuffling (Kolkman *et al.*, 2001).

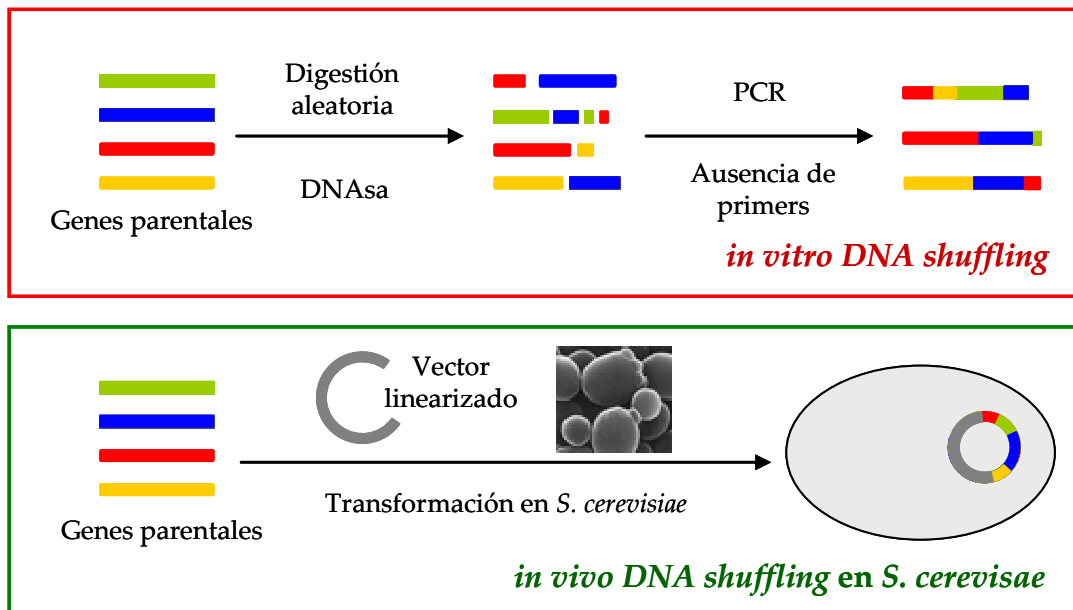


Figura 1.10. Métodos de recombinación *in vitro* e *in vivo* de ADN.

Las técnicas de recombinación *in vitro* de ADN demandan técnicas laboriosas de manipulación genética, que incluyen la fragmentación, la ligación a vectores de expresión y diversos ciclos de amplificación que pueden dar lugar a mutaciones indeseadas (Cherry *et al.*, 1999). Frente a esto, el barajado *in vivo* de ADN en la levadura *S. cerevisiae* es una herramienta fácil, rápida y no mutagénica utilizada para crear librerías altamente diversas en experimentos de evolución molecular dirigida (Figura 1.10) (Bulter *et al.*, 2003a), donde el único requisito para facilitar la recombinación y la reparación del vector de expresión es la existencia de 15 a 30 pares de bases solapantes entre los diferentes fragmentos de PCR y el vector de expresión (Manivasakam *et al.*, 1995). La baja frecuencia de recombinación homóloga de *E. coli* hace imposible el uso del *in vivo DNA shuffling* en la bacteria.

La gran versatilidad de la levadura ha dirigido a los científicos no sólo a clonar librerías de mutantes, sino también a desarrollar nuevos métodos *in vivo* alternativos a los protocolos tradicionales de generación de diversidad *in vitro* (Cherry *et al.*, 1999). El método *in vitro Sequence Overlap Extension* (SOE) (Ho *et al.*, 1989) ha sido utilizado para la construcción de librerías y en él se recombinan fragmentos de ADN que contienen mutaciones diana con el vector de expresión. El método IVOE (*In Vivo Overlap Extension*) (Alcalde *et al.*, 2006) consiste en crear dos o más productos de PCR a partir de nucleótidos degenerados en las posiciones sometidas a estudio, para

posteriormente facilitar su recombinación *in vivo* durante la transformación en *S. cerevisiae*, junto con el plásmido linearizado. Por otro lado, CLERY (*Combinatorial Libraries Enhanced by Recombination in Yeast*) es un método empleado con éxito que utiliza la recombinación *in vitro* e *in vivo* de ADN (Abecassis *et al.*, 2000).

1.5.3. METODOLOGÍAS DE SCREENING

Uno de los elementos más determinantes y críticos para alcanzar el éxito en un ensayo de evolución dirigida es el desarrollo de un método eficiente que permita detectar los mutantes que posean las propiedades deseadas (Zhao *et al.*, 1999).

Una técnica que permite detectar las propiedades de interés es la **selección biológica funcional**, cuyo prerequisite es la generación de una función que confiera crecimiento o ventaja de supervivencia al organismo huésped. Esto incluye desde el simple uso del sustrato de interés como fuente de carbono o nitrógeno, hasta métodos más sofisticados donde la actividad está directamente unida a un factor de supervivencia (Arnold *et al.*, 1999). Estos métodos de selección son muy específicos y difíciles de implementar productivamente. Normalmente se emplean para evolucionar enzimas intracelulares donde la unión entre la actividad enzimática y la supervivencia celular está muy clara, siempre que la actividad diana no interfiera con el metabolismo celular. Sin embargo, muchas aplicaciones de evolución molecular dirigida como, por ejemplo, la mejora de la estabilidad frente a temperatura o solventes orgánicos serían imposibles de abordar mediante esta metodología. Por lo tanto muchos investigadores se han centrado en el desarrollo de protocolos de exploración y selección, **screening**, para evolucionar propiedades no relacionadas con la supervivencia celular, donde cada miembro de la librería es analizado individualmente para la función buscada, contrariamente a lo que ocurre en la selección donde solo se mantienen los supervivientes (Williams *et al.*, 2004).

El *screening* debe asegurar que las pequeñas mejoras esperadas a partir de sustituciones de un único aminoácido puedan ser detectadas. Para ello, las condiciones del ensayo se ajustan en un punto en el que la enzima nativa o parental esté cerca del límite de detección más bajo (Zhao *et al.*, 1999). El mayor inconveniente del *screening* es que el tamaño de la librería que puede

explorarse es limitado. El *screening* se realiza habitualmente en placas multipocillo donde se crecen los mutantes de la genoteca, se induce la expresión de la proteína de interés, para posteriormente detectarla mediante métodos colorimétricos de detección de absorbancia o mediante la emisión de fluorescencia (Salazar *et al.*, 2003). Si la proteína no es extracelular será necesario un paso previo de lisis celular. Alternativamente se puede realizar un *screening* inicial en placas Petri que contengan el sustrato de la enzima, eliminando así los clones que no posean actividad (Zhao *et al.*, 1999).

El desarrollo de las técnicas sistemáticas o de *high-throughput* (Figura 1.11) ha permitido el desarrollo de métodos de *screening* rápidos, sensibles y de coste moderado, además de incrementar el tamaño de las librerías a explorar (miles de clones). La aparición de los robots manipuladores de líquidos ha posibilitado la reducción de la variabilidad y el aumento de la reproducibilidad de los métodos de *screening*, además de facilitar enormemente la tarea del investigador.



Figura 1.11. Robot manipulador de líquidos de 96 cabezales y lector de microplacas empleados en los experimentos de *high throughput screening* realizados en esta tesis.

Existe una gran variedad de ensayos disponibles para *high-throughput screening* de librerías enzimáticas (Williams *et al.*, 2004; Goddard *et al.*, 2004), incluyendo arrays de sustratos para el *fingerprinting* de enzimas (Joo *et al.*, 1999).

1.5.4. EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LACASAS DE ALTO POTENCIAL REDOX

La aplicación de lacasas a nivel industrial requiere de sistemas de expresión robustos que proporcionen altos niveles de enzima activa y permitan modular las propiedades catalíticas en función de las condiciones de reacción. El empleo de sistemas de expresión heterólogos posibilita la producción de lacasas de diferentes procedencias en un mismo hospedador, así como de nuevas variantes con propiedades mejoradas mediante técnicas de evolución molecular dirigida.

Hasta la fecha no se ha conseguido la expresión funcional de lacasas fúngicas en bacterias (*E. coli*). Sí se ha estudiado en profundidad la expresión heteróloga de lacasas fúngicas en huéspedes eucariotas, y a pesar de haberse descrito la expresión de las lacasas de los hongos *Trametes hirsutus*, *T. versicolor*, *Melanocarpus albomyces*, *P. ostreatus*, *Pycnoporus coccineus* y *P. eryngii* en *S. cerevisiae*, los niveles de expresión funcional detectados han sido notablemente bajos (Kunamneni *et al.*, 2008). Sin embargo, las técnicas de evolución molecular dirigida permiten la posibilidad de mejorar el nivel de expresión de las lacasas en *S. cerevisiae*, al mismo tiempo que se mejoran sus propiedades catalíticas o su estabilidad bajo determinadas condiciones de operación. Utilizando este procedimiento se consiguió incrementar hasta 18 mg/L la producción de lacasa del ascomiceto *M. thermophila* en *S. cerevisiae* (Bulter *et al.*, 2003b) y obtener un mutante altamente resistente a concentraciones de hasta 50 % de varios solventes orgánicos (Zumarraga *et al.*, 2007).

Hasta la fecha únicamente se ha publicado la mejora por evolución dirigida de lacasas de bajo potencial redox, centrándose en la lacasa del ascomiceto *M. thermophila* ($E^0 = +475$ mV). En estos trabajos, los niveles de expresión funcional en *S. cerevisiae* se lograron beneficiándose de la similitud existente entre el microorganismo de partida y el hospedador, ambos ascomicetos. Las lacasas de bajo potencial redox no pueden catalizar eficientemente la oxidación de moléculas con potenciales redox superiores al suyo (mediadores incluidos) lo que limita considerablemente su rango de actuación.

Desde el punto de vista de su aplicabilidad biotecnológica, las lacasas de alto potencial redox, producidas por hongos basidiomicetos, poseen un elevado interés. Por este motivo, se planteó en la presente tesis la expresión

funcional en *S. cerevisiae* y el desarrollo de ensayos de evolución molecular de una lacasa de alto potencial redox, en concreto de la lacasa del basidiomiceto ligninolítico *P. cinnabarinus*.

Pycnoporus cinnabarinus produce lacasa en elevadas cantidades como única oxidorreductasa ligninolítica, siendo, por tanto un organismo modelo para la producción de lacasa que ha llevado a alcanzar hasta 1,5 g/l en biorreactor bajo condiciones de inducción, (Lomascolo *et al.*, 2003). La lacasa de *P. cinnabarinus* posee un potencial redox de 0,79 V (Record *et al.*, 2002), el máximo descrito para las lacasas fúngicas, y posee una buena termoestabilidad (Ibarra *et al.*, 2006b). Además, tiene un enorme potencial de aplicación biotecnológica demostrado en diversos estudios (Camarero *et al.*, 2002; Georis *et al.*, 2003; Sigoillot *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2006b; Camarero *et al.*, 2007). Estas propiedades fundamentales, junto con el hecho de que se disponga de su estructura tridimensional, convierten a esta enzima en un punto de partida ideal para realizar estudios de evolución dirigida encaminados a modular sus propiedades de acuerdo a las necesidades de aplicación.

2. Objetivos

Esta tesis tiene como objetivo general el diseño de nuevos sistemas lacasa-mediador que ayuden a resolver los problemas que impiden la aplicación biotecnológica de estos sistemas enzimáticos enormemente versátiles. Algunos de estos problemas son el elevado coste de los mediadores sintéticos o su posible toxicidad, así como la necesidad de disponer de niveles suficientes de lacasas recombinantes activas y estables en condiciones industriales.

Este objetivo se ha abordado desde dos vías de estudio independientes pero complementarias:

1. La búsqueda y empleo de compuestos mediadores de origen natural (obtenidos de la lignocelulosa), que sean eficaces, seguros para el medio ambiente y de bajo coste, como alternativa al empleo de mediadores artificiales.
2. La obtención de lacasas recombinantes y su mejora mediante el diseño por evolución molecular dirigida con objeto de obtener enzimas a la carta con mayor actividad catalítica, y/o más estables en condiciones de aplicación industrial.

3. Materiales y Métodos

TABLAS DE COMPUESTOS Y REACTIVOS UTILIZADOS

Sustratos de Lacasa	Nº C.A.S.	Casa Comercial
2,2'-Azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS)	30931-67-0	Roche
1-Hidroxibenzotriazol (HBT)	123333-53-9	Sigma
2,6-Dimetoxifenol (DMP)	91-10-1	Fluka
Ácido <i>p</i> -cumárico	501-98-4	Sigma
Ácido ferúlico	537-98-4	Aldrich
Ácido sinápico	530-59-6	Aldrich
Acetosiringona	2478-38-8	Sigma
Siringaldehído	134-96-3	Aldrich
Vainillina	121-33-5	Sigma
Acetovainillona	498-02-2	Aldrich
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos		
Antraceno	120-12-7	Sigma
9,10-Antraquinona	84-65-1	Sigma
Benzo[a]pireno	50-32-8	Sigma
Pireno	129-00-0	Sigma
Fenantreno	81-01-8	Sigma
Colorantes		
<i>Acid Blue 74</i> (Índigo carmín)	860-22-0	Sigma
<i>Aniline Blue</i>	66687-07-8	Sigma
<i>Azure B</i>	531-55-5	Sigma
<i>Reactive Blue 19</i> (<i>Remazol Brilliant Blue R</i>)	2580-78-1	Sigma
<i>Reactive Black 5</i>	17095-24-8	Dye star
<i>Reactive Blue 38</i>	12236-90-7	Dye star

Reactivos	Nº C.A.S.	Casa Comercial
Acetona	67-64-1	Merck
Acetonitrilo	75-05-8	Lab-Scan
Ácido acético	64-19-7	Merck
Ácido cítrico	77-92-9	Merck
Ácido fórmico	64-18-6	Merck
Ácido linoleico	60-33-3	Sigma
Ácido tiobarbitúrico	504-17-6	Sigma
Ácido tricloroacético	76-03-9	Sigma
Acrilamida/Bis 30 %	79-06-1	Bio-Rad
Agarosa	9012-36-6	Bio-Rad
Agarosa de bajo punto de fusión	39346-39-1	Bio-Rad
Ampicilina	7177-48-2	Sigma
Borohidruro de Sodio	16940-66-2	Sigma
Bromuro de etidio	1239-45-8	Sigma
BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	9048-46-8	Sigma
Butanol	71-63-3	Merck
Cloranfenicol	56-75-7	Sigma
<i>Coomasie Brilliant Blue R250</i>	6104-59-2	Fluka
2,4-Dimetoxibenceno	150-78-7	Sigma
Etanol	64-17-5	Merck
Acetato de etilo	141-78-6	Merck
Hidroxitolueno butilado	128-37-0	Sigma
<i>High Range Molecular Weight Protein Standards</i>		Bio-Rad
Mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs)		Sigma
<i>Molecular Weight MarkerDNA</i>		Roche
<i>Protein Assay Dye Reagent (Bradford)</i>		Bio-Rad
Persulfato potásico	7727-21-1	Sigma
Trolox	53188-07-1	Sigma
Tween 20	9005-64-5	Sigma
Tween 80	9005-65-6	Sigma
Zeocina	11006-33-0	Invivogen

Componentes de medios de cultivo	Referencia	Casa Comercial
Bacto Tristona	211705	Disco
Bacto Peptona	211677	Disco
Extracto de levadura	212750	Disco
Extracto de malta	218610	Disco
Bacto Agar	214010	Disco
<i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB)	291940	Sigma
Complemento de aminoácidos sin uracilo	Y-1501	Sigma
D-(+)-Glucosa	G-5767	Sigma
D-(+)-Galactosa	G-0750	Sigma
D-(+)-Rafinosa pentahidrato	R-0250	Sigma
EDTA	E-5134	Sigma
Glicerol	G-5516	Sigma
MOPS	M-51621	Sigma
Sulfato de cobre	C-7631	Sigma
Kits de Biología Molecular		
<i>Yeast transformation kit</i>	YEAST1-1KT	Sigma
<i>Zymoprep, Yeast Plasmid Miniprep</i>	D2001	Zymo Research
<i>Zymoclean Gel DNA recovery Kit</i>	D4001	Zymo Research
<i>Wizard Plus SV Minipreps Kit</i>	A1120	Promega
Enzimas Comerciales		
Enzima de restricción BamHI	R0136	New England Biolab
Enzima de restricción Xho I	R0146	New England Biolab
Enzima de restricción EcoRI	R0101	New England Biolab
Enzima de restricción NotI	R0189	New England Biolab
Enzima de restricción BglII	R0144	New England Biolab
Ligasa ADN T4	M0202	New England Biolab
Taq polimerasa	D-4545	Sigma
<i>Genemorph random mutagenesis kit</i> (Mutazyme™)	600550	Stratagene
<i>PfuUltra High-Fidelity</i> ADN polimerasa	600380	Stratagene
PNGasa F	P-7367	Sigma

3.1. MEDIADORES REDOX DE LACASA DE ORIGEN NATURAL

3.1.1. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA LACASA DE *Pycnoporus cinnabarinus*

La lacasa de *P. cinnabarinus* fue producida por Beldem (Bélgica) a partir de la cepa monocariótica hiperproductora ss3 obtenida de la cepa I-937 (Herpoël *et al.*, 2000).

Proceso de purificación:

1. Eliminación del glicerol presente en el crudo enzimático suministrado por Beldem mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 9 h a 4 °C.
2. Concentración de baja presión por ultrafiltración con membrana de 3 kDa de tamaño de poro (Amicon YM3, Millipore) en un Amicon® de Millipore, gracias a la presión ejercida por nitrógeno.
3. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución: la muestra, previamente dializada, se purificó utilizando una columna *Resource Q* (Amersham Biosciences) acoplada a un equipo *AKTApurifier* (Amersham Biosciences). Se equilibró la columna con acetato sódico 25 mM pH 5,0 y la fracción retenida se eluyó con un gradiente en dos fases con NaCl 1 M en acetato sódico 25 mM, pH 5,0, de 0 a 20 % (v/v) en 20 min y de 20 a 100 % (v/v) en 10 min, a un flujo de 6 mL/min. La proteína se detectó a 280 y a 608 nm (máximo de absorbancia del Cu T1 en las lacasas). El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo con el software UNICORN 3.0 (Amersham Biosciences).
4. Las fracciones con actividad lacasa se dializaron en tampón acetato sódico 25 mM pH 5,0 y se congelaron a -80 °C hasta su uso.

3.1.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.1.2.1. Determinación de proteínas

La cantidad de proteínas presente en una muestra se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo y procedimiento establecido por Bio-Rad *Protein Assay Dye Reagent*. El ensayo se basa en el cambio de absorbancia de 465 a 595 nm que experimenta una solución ácida de colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* al unirse a las proteínas. La

concentración de proteína se calculó refiriendo los datos de absorbancia a una curva patrón de albúmina de suero bovino a una concentración entre 2 y 20 $\mu\text{g/mL}$. La recta de regresión fue lineal hasta una absorbancia de 0,6 a 595 nm.

3.1.2.2. Valoración de actividad lacasa

La actividad lacasa se determinó por la oxidación de ABTS 5 mM en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 siguiendo la formación de su radical catiónico a 436 nm (ϵ_{436} 29.300 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 y a temperatura ambiente. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para obtener un μmol de producto en un minuto.

Alternativamente, la actividad lacasa se determinó también con el sustrato fenólico 2,6-dimetoxifenol (DMP) en las mismas condiciones (ϵ_{469} 27.500 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

3.1.2.3. Cálculo de parámetros cinéticos

Las constantes cinéticas de la oxidación de los diferentes sustratos por la lacasa de *P. cinnabarinus* se determinaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. Las reacciones se llevaron a cabo en cubetas de 1 mL con tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0, a temperatura ambiente, utilizando 100 mU de enzima pura. Previamente, los cambios en los espectros de absorbancia de los diferentes sustratos, bajo las mismas condiciones de reacción, permitieron seleccionar las longitudes de onda a las que calcular los correspondientes coeficientes de extinción molar.

Para el cálculo de las constantes cinéticas se utilizaron concentraciones crecientes de los sustratos a oxidar valorándose el descenso de absorbancia por desaparición de sustrato en el caso de acetosiringona (ϵ_{320} 6.000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), sirringaldehído (ϵ_{320} 8.500 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), acetovainillona (ϵ_{304} 7.100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), vainillina (ϵ_{308} 9.200 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), ácido *p*-cumárico (ϵ_{312} 11.100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), ácido sinápico (ϵ_{312} 16.100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), ácido ferúlico (ϵ_{320} 12.500 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y el colorante *Acid Blue* 74 (ϵ_{608} 17.200 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$); o por el incremento en la absorbancia de los productos de oxidación en el caso de: ABTS (ϵ_{436} 29.300 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), DMP (ϵ_{469} 27.500 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y sirringaresinol (ϵ_{300} 1.500 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

La constante de afinidad (constante de Michaelis, K_m) y la constante catalítica, k_{cat} se obtuvieron ajustado los datos experimentales mediante regresión no lineal con el paquete informático SigmaPlot 2001. En el cálculo

de la constante se utilizó la masa molecular de la proteína (65 kDa) y la concentración de la misma obtenida mediante el ensayo de Bradford. Dichas constantes se utilizaron para estimar la eficiencia catalítica de la enzima por el sustrato ensayado (k_{cat}/K_m).

3.1.3. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS RELACIONADOS CON LA LIGNINA

3.1.3.1. Efecto sobre el crecimiento de *P. cinnabarinus* en placa

Se ensayó el crecimiento de *P. cinnabarinus* en placas de agar-malta en presencia de acetosiringona, sir ingaldehído, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácido sinápico (0,25 y 1 mM). Inóculos de 5 mm de diámetro fueron colocados en el centro de las placas Petri con agar malta (Tabla 3.1), midiéndose el crecimiento cada 24 h, y expresándolo como porcentaje respecto a la colonización total de la placa por el hongo en ausencia de estos compuestos, alcanzada a los 13 d. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo agar malta

Extracto de malta	15 g/L
Agar	20 g/L
Compuestos fenólicos ¹	0,25 y 1 mM

Esterilizar a 110 °C durante 30 min.

¹Esterilizar por filtración. Añadir cuando el medio esté a ~ 50 °C.

3.1.3.2. Capacidad antioxidante: Ensayo TEAC

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos relacionados con la lignina se determinó a través del ensayo TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a la de Trolox, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilmroman-2-carboxílico) (Re *et al.*, 1999; van den Berg *et al.*, 1999) con ligeras modificaciones. Este ensayo determina la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir el radical ABTS•⁺ (Arts *et al.*, 2004).

El radical ABTS•⁺ se generó químicamente haciendo reaccionar ABTS 7 mM y persulfato potásico 2,45 mM, ambos disueltos en agua, durante 12-16 h en oscuridad y a temperatura ambiente.

El radical formado se diluyó con etanol, PBS pH 7,4 o citrato sódico pH 5,0 hasta obtener una absorbancia de 0,7 a 734 nm (de esta forma la concentración final de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ fue 47 μM).

La reacción de reducción de 990 μL de la solución de radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se llevó a cabo con 10 μL de las correspondientes soluciones *stock* de los compuestos fenólicos hasta concentraciones finales de los mismos de 12,5 μM . Se determinó el descenso de absorbancia a 734 nm durante 6 minutos y se comparó con el descenso obtenido con el antioxidante de referencia Trolox.

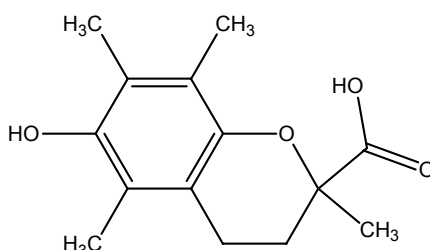


Figura 3.1. Estructura del antioxidante Trolox

3.1.3.3. Capacidad mediadora de los ácidos *p*-hidroxicinámicos en reacciones con lacasa y ABTS

La oxidación enzimática del ABTS (50 μM) se realizó con 50 mU de lacasa de *P. cinnabarinus* en tampón citrato sódico 100 mM, pH 5,0 a 24 °C. Una vez que la oxidación a radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ fue completa (5 min), 50 μM de ácido sinápico, ferúlico o *p*-cumárico se añadieron a la mezcla de reacción, recogiendo los cambios en el espectro UV-Visible con ayuda de un espectrofotómetro con detector de diodos (Agilent 8453). Se recogieron también los cambios en los espectros UV-Visible de la oxidación de los ácidos *p*-hidroxicinámicos por la lacasa sola.

3.1.4. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR LACASA Y FENOLES RELACIONADOS CON LA LIGNINA

3.1.4.1. Ensayo colorimétrico de detección de 9,10-antraquinona a partir de antraceno

Se incubó antraceno 250 μM (disuelto en acetona, de forma que la concentración final de ésta no superase el 2 % (v/v) en la reacción) con 2 U/mL de lacasa de *P. cinnabarinus* y acetosiringona, siringaldehído,

vainillina, acetovainillona o ácido *p*-cumárico 500 µM como mediadores. Las reacciones se llevaron a cabo en tampón citrato sódico 100 mM, pH 5,0, a temperatura ambiente, en agitación continua y completa oscuridad. A la mezcla de reacción final se añadió 1 % (v/v) de Tween 20 como surfactante para asegurar la solubilidad del hidrocarburo aromático policíclico (PAH) y sus productos de oxidación. Reacciones con la enzima en ausencia de mediador y en presencia del mediador artificial HBT se utilizaron como controles negativo y positivo, respectivamente.

Se tomaron muestras después de 0, 4, 24 y 48 h y se evaluó la presencia de 9,10-antraquinona en la mezcla de reacción, mediante su reducción a 9,10-hidroantraquinona con NaBH₄ 3,7 M en 40 % (v/v) de NaOH. El producto reducido coloreado fue detectado a 419 nm en un espectrofotómetro Shimadzu (Alcalde *et al.*, 2002). La absorbancia de los mediadores oxidados a 419 nm se utilizó como blanco.

3.1.4.2. Ensayos de transformación de PAHs por lacasa en presencia de mediadores naturales

Las reacciones enzimáticas se realizaron en viales de 2-4 mL sellados con tapones de teflón, en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0, con 2 U/mL de lacasa purificada de *P. cinnabarinus* y 50 µM del PAH correspondiente (disuelto en acetona de forma que la concentración final de la misma en la mezcla de reacción no superase el 2 % (v/v)). Se añadió 1 % (v/v) de Tween 20 para conseguir la total solubilidad de los PAHs y se incubó a 30 °C, en completa oscuridad y continua agitación orbital. A diferentes tiempos de incubación (0, 2, 6, 24, 48 y 72 h) se pararon las reacciones añadiendo 50 % de acetonitrilo y congelando rápidamente las muestras.

En los diferentes experimentos se añadieron mediadores en las condiciones que se indican a continuación:

La comparación de la capacidad de los diferentes compuestos fenólicos para promover la transformación oxidativa de antraceno y benzo[a]pireno (50 µM) por lacasa se realizó con una concentración de 500 µM de acetosiringona, siringaldehído, vainillina, acetovainillona, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico o ácido sinápico. Se incluyeron en el ensayo los mediadores artificiales HBT y ABTS en la misma concentración.

Para determinar el efecto de la concentración óptima de ácido *p*-cumárico como mediador en la transformación de antraceno (50 μM), se ensayaron concentraciones del mediador de 50, 100, 200, 500 μM y 1 mM.

El ensayo comparativo de la degradación de antraceno, benzo[a]pireno y pireno por lacasa y ácido *p*-cumárico se llevó a cabo con dos concentraciones diferentes (100 μM y 1 mM) de este mediador.

En todos los casos, se realizaron paralelamente, ensayos con lacasa sola en ausencia de mediador, así como reacciones con enzima hervida como controles.

3.1.4.3. Cuantificación de la transformación de PAHs

La separación de los PAHs y sus productos de oxidación se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de fase reversa, utilizando un equipo Pharmacia LKB 2248 equipado con un detector Pharmacia VWM. Los porcentajes de degradación de los PAHs y la cantidad de 9,10-antraquinona producida se calcularon basándose en las áreas y tiempos de retención de los estándares comerciales.

Las muestras (10 μL) se inyectaron en una columna Purospher® STAR RP-18 (5 μm , 4,6 – 250 mm) a 40 °C y a un flujo de 1 mL/min. La columna se equilibró durante 3 min con ácido acético al 0,1 % (v/v) y acetonitrilo al 20 % (v/v). Los compuestos se eluyeron de la columna con un gradiente lineal de 20 a 100 % (v/v) de acetonitrilo en 15 min, siguiendo la elución durante 5 min más. Los PAHs y sus productos de degradación se detectaron a 251 nm.

3.1.4.4. Extracción e identificación de productos minoritarios de oxidación de PAHs

Alternativamente, para la detección e identificación de productos de oxidación minoritarios, las mezclas de reacción fueron extraídas con 3 volúmenes de acetato de etilo, y posteriormente evaporadas con nitrógeno y resuspendidas en 100 μL de acetonitrilo antes de su análisis por HPLC. Como patrón interno se añadió 1,4-dimetoxibenceno (500 μM) antes de la extracción. Los extractos de las muestras fueron transferidos a placas de 96 pocillos (Brand) y centrifugadas durante 5 min a 2.200 g en una centrífuga Eppendorf 5810R. Las placas fueron selladas (*seal-plate tape Whatman uniseal* 7704-0001) e introducidas en un autosampler *high-throughput* para HPLC (VWR, Hitachi L2200). Finalmente, las muestras se analizaron utilizando una columna de fase reversa Nucleosil-C18 (3 μm , 80 x 4 mm) a una

temperatura constante de 15 °C. Los compuestos se eluyeron a un flujo de 1 mL/min (bombas Varian 9012) en condiciones isocráticas con un 70 % (v/v) de acetonitrilo y un 30 % (v/v) de agua, en las reacciones con antraceno, y un 60 % (v/v) de acetonitrilo y un 40 % (v/v) de agua, en el caso del benzo[a]pireno.

La detección de los compuestos se llevó a cabo con un detector de diodos PAD (Varian Prostar, US), captando su espectro UV-visible en el rango de 200 a 600 nm. La integración se realizó con el software Varian Star 6.41.

3.1.4.5. Identificación de los productos de oxidación de PAHs por lacasa-ABTS mediante LC/MS

Los productos desconocidos generados durante la oxidación de antraceno y benzo[a]pireno por lacasa y el mediador artificial ABTS fueron analizados por HPLC/MS.

Tras la separación cromatográfica de los analitos usando un HPLC 1100 (*Agilent Technologies*) bajo las condiciones de carrera descritas en el apartado anterior para los análisis de HPLC-PAD, éstos fueron analizados en un espectrómetro de masas cuadrupolo de alta resolución con analizador TOF de tiempo de vuelo (QSTAR® XL *Hybrid LC/MS/MS System*, Applied Biosystems) con interfase de electrospray. Los parámetros del espectrómetro de masas fueron ajustados de la siguiente manera: voltaje del *spray* ionizador 4500 V, presión de la fuente de gas ionizador número 1 70 psi, presión de la fuente de gas ionizador número 2 65 psi, presión de la cortina de gas 20 psi, potencial *declustering* 30 V, potencial de focalización número 1 180 V y potencial de focalización 2 15 V.

Los análisis mediante ionización química directa a presión atmosférica (APCI-FIA) se realizaron a diferentes energías de fragmentación (30, 60, 90 y 120 V), usando ácido fórmico al 0,1 % (v/v) y acetonitrilo al 50 % (v/v) como solvente a un flujo de 0,2 mL/min, a 350 °C de temperatura de vaporización y a 45 psi de presión de nebulización.

Las técnicas de impacto electrónico se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas VG AutoSpec con un analizador magnético. Las muestras se introdujeron en el sistema por inyección directa a 200 °C y 70 eV de energía electrónica.

3.1.4.6. Ensayos toxicológicos

El benzo[a]pireno se utilizó como PAH modelo para llevar a cabo los ensayos de toxicidad. Se emplearon diferentes test toxicológicos para obtener los valores de CE₅₀ del benzo[a]pireno y de las mezclas de degradación del mismo. Este valor representa la concentración de la muestra a la cual se produce una reducción del 50 % de actividad metabólica en el caso del ensayo con bacterias, de inhibición de crecimiento en el ensayo de algas o de inhibición de la movilidad en el ensayo de crustáceos.

Para el cálculo del valor de CE₅₀ del benzo[a]pireno se expusieron los organismos a concentraciones crecientes del mismo. La toxicidad aguda de las mezclas de reacción conteniendo benzo[a]pireno (2,5 µM) se determinó antes y después de su degradación por la lacasa de *P. cinnabarinus* en presencia de ácido *p*-cumárico (relación mediador/PAH de 10) durante 72 h y en las condiciones establecidas en el apartado 3.1.4.2. El mediador artificial HBT se incluyó también en el ensayo de toxicidad en *Daphnia magna*.

El ensayo Microtox® se realizó en colaboración con el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago, mientras que los test de toxicidad en algas y crustáceos fueron realizados por el Área de Toxicología Ambiental del Centro Nacional de Sanidad Ambiental (Instituto de Salud Carlos III), laboratorio acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC).

- **Microtox®**

El método se basa en la reducción de bioluminiscencia de la bacteria *Photobacterium phosphoreum* como consecuencia de la exposición a la muestra objeto de ensayo. Se realizó la incubación de la muestra midiendo los niveles de emisión de luz iniciales y tras 5 ó 15 min de exposición, de acuerdo con el procedimiento establecido en la norma ISO 11348-3, 1998.

- **Inhibición del crecimiento de *Scenedesmus subspicatus***

El ensayo se basa en la inhibición del crecimiento que sufre el alga verde unicelular de agua dulce *S. subspicatus* tras ser expuesta durante 72 h a la mezcla objeto de estudio, según el procedimiento de la norma ISO 8692: 1989.

- **Inhibición de la movilidad de *Daphnia magna***

Se determinó la toxicidad aguda de la mezcla mediante la inhibición sufrida en la movilidad del crustáceo *D. magna* tras 48 h de exposición, según el procedimiento establecido en la norma ISO 6341:1996.

3.1.4.7. Peroxidación de lípidos: Producción de TBARS

La capacidad de la lacasa y los ácidos *p*-hidroxicinámicos para llevar a cabo la peroxidación de los lípidos se estudió en viales de 4 mL donde se añadieron 2 U/mL de lacasa de *P. cinnabarinus* en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 y ácido linoleico 0,7 mM ó Tween 80 2 mM como fuentes de ácidos grasos insaturados, así como dos concentraciones diferentes de mediador (0,5 y 2 mM). El HBT fue incluido en la comparación.

En el proceso de peroxidación de ácidos grasos insaturados se generan hidroperóxidos inestables que dan lugar a aldehídos, siendo el más abundante el malondialdehído. Estos aldehídos reaccionan con el ácido tiobarbitúrico formando un complejo que absorbe fuertemente a 532 nm (Buege *et al.*, 1978; Esterbauer *et al.*, 1990).

La producción de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se determinó a diferentes tiempos de reacción tomando muestras de 0,5 mL y añadiendo 1,1 mL de acetato sódico 3,3 M a pH 3,5, 1,3 mL de ácido tiobarbitúrico al 0,85 % (v/v) (TBA) y 40 µL de hidroxitolueno butilado (BHT) al 0,8 % (p/v) en ácido acético. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 30 min y una vez enfriadas, se extrajeron las muestras con 3 mL de butanol para eliminar la turbidez, se centrifugaron durante 10 min a 2.000 g y se midió la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160, a temperatura ambiente.

3.1.4.8. Oxidación de fenantreno vía peroxidación de lípidos con lacasa y ácido *p*-cumárico

La oxidación de fenantreno (50 µM) por lacasa y ácido *p*-cumárico se llevó a cabo en presencia de 1 % (v/v) de Tween 80 o Tween 20 como fuente de lípidos insaturados o como control, respectivamente. En la mezcla de reacción se añadieron 2 U/mL de enzima y ácido *p*-cumárico (o HBT) a una concentración final de 2 mM, en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0. Los viales de 2-4 mL se mantuvieron sellados con tapones de teflón a 30 °C y en continua agitación orbital durante 9 días. Las muestras tomadas a los 2, 5, 7 y 9 días se diluyeron con acetonitrilo al 50 % (v/v) y se congelaron

rápida hasta su análisis por HPLC. Las condiciones analíticas fueron análogas a las descritas en el apartado 3.1.4.3. Reacciones con lacasa en ausencia de mediador y Tween 80 y con enzima hervida, se realizaron paralelamente como controles.

3.1.5. OXIDACIÓN DE COLORANTES POR LACASA Y ÁCIDOS *p*-HIDROXICINÁMICOS

3.1.5.1. Decoloración de diferentes tipos de colorantes

Se ensayó la decoloración de seis tipos de colorantes (Tabla 4.6) con la lacasa de *P. cinnabarinus* en presencia de los ácidos *p*-cumárico, ferúlico o sinápico como mediadores. Los ensayos se realizaron con una concentración de 25 μ M de colorante, 100 mU/mL de lacasa y diferentes concentraciones de mediador (25, 50 100 o 250 μ M). Las reacciones se llevaron a cabo en tampón citrato sódico 100 mM, pH 5,0 a 24 °C, en oscuridad y a 160 rev/min. El descenso de absorbancia se midió a diferentes tiempos de incubación en las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorbancia de cada colorante (Tabla 4.6) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

3.1.5.2. Inhibición de la decoloración

La inhibición producida por el ácido ferúlico en la decoloración de *Reactive Blue 19* por la lacasa de *P. cinnabarinus*, se estudió incubando dicho compuesto fenólico (250 μ M) en citrato sódico 100 mM, pH 5,0 a 24 °C con 100 mU/ml de lacasa durante diferentes tiempos. Transcurridos éstos se añadió *Reactive Blue 19* (25 μ M) y se midió el descenso de absorbancia a 592 nm durante 3 h.

El efecto de la concentración de ácido ferúlico en la decoloración del colorante *Reactive Blue 38* se estudió incubando el colorante (25 μ M) con ácido ferúlico en cuatro concentraciones diferentes: 3,125 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M y 25 μ M, en las condiciones indicadas en el apartado anterior. Se midió la absorbancia a 620 nm durante 3 h.

3.1.5.3. Ensayos con siringaresinol

El siringaresinol (3,6-bis-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-tetrahidrofuro [3,4-c]furano) fue sintetizado en la Universidad de Helsinki, mediante el acoplamiento oxidativo β - β' del alcohol sinápico (alcohol 4-hidroxi-3,5-

dimetoxicinámico) en una reacción de deshidrogenación “*zulauf*” catalizada por la peroxidasa de rábano en presencia de peróxido de hidrógeno. El aislamiento del producto dímérico (con un rendimiento del 25 %) se realizó con un equipo de cromatografía (Biotage), y su pureza fue chequeada por RMN.

La capacidad del siríngaresinol para actuar como mediador en la oxidación de colorantes se ensayó con los tintes *Reactive Black 5*, *Azure B*, *Reactive Blue 19*, *Aniline Blue* y *Acid Blue 74* (25 µM), en presencia de 100 mU de lacasa y dos concentraciones de siríngaresinol (50 y 250 µM). La reacción se llevó a cabo en tampón citrato sódico 100 mM, pH 5,0, a 24 °C, en oscuridad y a 160 rev/min. El descenso en las absorbancias características de cada colorante (Tabla 4.6) se determinó con la ayuda de un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

3.1.5.4. Evaluación de la toxicidad: Microtox®

Se estudió el descenso de toxicidad del *Acid Blue 74* tras su decoloración durante 2h por lacasa y ácido *p*-cumárico, empleando el test Microtox®, de acuerdo con el apartado 3.1.4.6.

3.2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LACASAS DE ALTO POTENCIAL REDOX

3.2.1. MICROORGANISMOS

- *Saccharomyces cerevisiae* cepa **BJ5465** (ATCC 208289, LGC Promochem). Genotipo: MAT α *ura3-52 trp1 leu2-delta1 his3-delta200 pep4::HIS3 prb1-delta1.6R can1*. Cepa deficiente en proteasas, adecuada para la expresión y secreción de proteínas heterólogas (Parekh *et al.*, 1995) que se utilizó como huésped para la expresión de genes evolucionados artificialmente de la lacasa de *P. cinnabarinus* clonada en el plásmido pJRoC30 (Bulter *et al.*, 2003a).
- *Escherichia coli* cepa **XL2-blue** (Stratagene). Genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac1^qZAM15 Tn10* (Tet^r) *Amy Cam^r*]. Células ultracompetentes con una eficiencia de transformación superior a 5x10⁹ transformantes por μ g de ADN. Esta cepa se utilizó para producir y purificar con mayor rendimiento los genes de las lacasas durante el proceso de evolución.
- *Escherichia coli* cepa **DH5 α** . (Invitrogen). Genotipo: *supE44 Δ lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*. Se emplearon células competentes de esta cepa para purificar y producir el gen de la lacasa de *P. cinnabarinus* clonado en el plásmido pGAPZ α y pJRoC30.

3.2.2. VECTORES PLASMÍDICOS

- **pGAPZ α** (Invitrogen). Vector de 3100 pb que utiliza el promotor GAP para expresar constitutivamente proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. Se ha empleado para producir proteínas fusionadas en el extremo N terminal al pre-propéptido del factor de secreción α de *S. cerevisiae*. El factor de selección en este vector se basa en el marcador de resistencia a zeocina, el cual es funcional tanto en *P. pastoris* como en *E. coli*.
- **pJRoC30** (Novozymes). Vector episómico bifuncional de 10477 pb (12229 pb incluyendo el gen de la lacasa de *P. cinnabarinus* y el factor α). pJRoC30 es portador del promotor GAL1 (inducible por galactosa), del gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* y del gen URA3 que confiere auxotrofia para uracilo.

3.2.3. GEN PARENTAL DE LA LACASA DE *P. cinnabarinus*

El gen parental utilizado en este trabajo es el ADNc *lac1* de la lacasa de *P. cinnabarinus* (denominado en este trabajo PcL), cuya secuencia se encuentra depositada en la base de datos de secuencias de ADN GenBank (Gen Bank *accession number*: AF170093). La secuencia del ADNc que codifica para la lacasa madura suma un total de 1494 pb.

3.2.4. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Las composiciones que se detallan a continuación están referidas a un volumen final de 1 L. Salvo que se indique lo contrario, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121 °C.

3.2.4.1. Medios de cultivo para bacterias (*E. coli*)

- **Medio Luria-Bertani LB/amp/zeocina** (Sambrook *et al.*, 1989): medio para el crecimiento y selección de células transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina (que contienen el vector pJRoC30) en el caso de LB/amp y para transformantes resistentes a zeocina (que contienen el vector pGAPZα), el medio LB/zeozina.

Bacto Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Zeozina estéril (100 mg/mL) ¹	0,5 mL
Ampicilina estéril (100 mg/mL) ¹	1 mL

¹Esterilizar por filtración.

Ajustar a pH 7,0 con NaOH.

Añadir la ampicilina o la zeozina cuando el medio esté a ~ 50 °C.

Para obtener medio sólido, añadir 20 g de agar antes de la esterilización.

- **Medio Ψ broth:** medio para el crecimiento de bacterias, se utiliza en la preparación de células competentes de *E. coli* DH5α.

Bacto Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4 g
KCl	7,5 mL

Ajustar a pH 7,6 con KOH.

3.2.4.2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

- **Medio YP (1,55X)**

Bacto Peptona	30,77 g
Extracto de levadura	15,38 g

Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad a 4 °C.

- **Medio YPD:** medio para el crecimiento general de levaduras.

Bacto Peptona	20 g
Extracto de levadura	20 g
Glucosa 20 % (p/v) ¹	100 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol ¹	1 mL

¹Esterilizar por filtración.

Añadir la glucosa y el cloranfenicol cuando el medio esté a ~ 50 °C.

Para preparar medio sólido, añadir 20 g de agar antes de la esterilización.

Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad a 4 °C.

- **Medio Mínimo líquido:** medio selectivo sin uracilo para el crecimiento de transformantes que contienen el vector pJRoC30.

Medio YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>) (67 g/L) ¹	100 mL
Complemento de aminoácidos sin uracilo (10X) ¹	100 mL
Rafinosa 20 % (p/v) ^{1,2}	100 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol ¹	1 mL

¹Esterilizar por filtración.

²Mantener a temperatura ambiente ya que precipita en frío.

Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad a 4 °C.

- **Medio Mínimo sólido:** para placas SC *drop-out*.

Bacto agar	20 g
Medio YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>) (67 g/L) ¹	100 mL
Complemento de aminoácidos sin uracilo (10X) ¹	100 mL
Glucosa 20 % (p/v) ¹	100 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol ¹	1 mL

¹Esterilizar por filtración.

Añadir todos los componentes excepto el agar cuando el medio se encuentre a ~ 50 °C.

- **Medio de expresión:** medio para la expresión de lacasa en *S. cerevisiae*.

Medio YP (1,55X)	720 mL
Tampón KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6,0) ¹	67 mL
CuSO ₄ (1 M) ^{1,2}	2 ó 4 mL
Etanol ^{1,3}	30,9 mL
Galactosa 20 % (p/v) ¹	110 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol ¹	1 mL

¹Esterilizar por filtración.

²Se utilizaron diferentes concentraciones de CuSO₄ en los experimentos de optimización de la expresión en microcultivos (desde 10 µM hasta 4 mM) y en matraces (desde 1 hasta 13 mM). Finalmente se utilizó 2 mM para los experimentos de evolución dirigida en microplaca y 4 mM para la producción de lacasa en matraz.

³En los experimentos de optimización de la expresión y producción de lacasa en microcultivo, se empleó medio de expresión con y sin etanol.

3.2.4.3. Soluciones y tampones

- **Solución TFB1:** solución utilizada en la transformación de *E. coli* DH5α.

RbCl ¹	100 mM
MnCl ₂ ¹	50 mM
CH ₃ COOK ¹	30 mM
CaCl ₂ ¹	10 mM
Glicerol ¹	15 % (v/v)

¹Esterilizar por filtración.

Una vez preparado, mantener la solución en oscuridad a 4 °C.

- **Solución TFB2:** solución utilizada en la transformación de *E. coli* DH5α.

RbCl	10 mM
MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glicerol	15 % (v/v)

¹Esterilizar por filtración.

Ajustar a pH 7,0 con NaOH.

Una vez preparado, mantener la solución en oscuridad a 4 °C.

- **Solución SOB** (Sambrook *et al.*, 1989) solución *stock* para transformación en *E. coli* XL2-*blue*.

Bacto Tristona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g
KCl (250 mM)	10 mL

Ajustar a pH 7,0 con NaOH.

Puede prepararse y almacenarse a 4 °C durante largos periodos de tiempo.

- **Medio SOC** (Sambrook *et al.*, 1989) solución de trabajo para transformación en *E. coli* XL2-*blue*.

Solución SOB	5 mL
MgCl ₂ estéril (2 M) ¹	25 µL
Glucosa 20 % (p/v) ¹	100 µL

¹Esterilizar por filtración.

Preparar nuevo para cada transformación.

- **TAE 1X:** tampón utilizado para electroforesis en geles de agarosa

Tris-base	40 mM
Ácido acético	20 mM
EDTA	1 mM

Ajustar a pH 8,0.

3.2.5. MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS

La cepa silvestre de *S. cerevisiae* se incubó en placas de YPD durante 48 h a 30 °C. Posteriormente, colonias aisladas se transfirieron a tubos de 20 mL con 3 mL de YPD. Los tubos se incubaron a 30 °C y 210 rpm (incubador Micromagmix, Ovan) y cuando los cultivos alcanzaron densidades ópticas (DO₆₀₀) entre 1 y 2, se prepararon suspensiones celulares en glicerol estéril al 20 % (v/v) y se almacenaron a -80 °C.

Los transformantes de *S. cerevisiae* conteniendo el plásmido pJRoC30 se crecieron en placas con medio mínimo sólido durante 2-3 días a 30 °C. Se transfirieron colonias individuales a tubos de 20 mL con 3 mL de medio

mínimo, incubándose a 30 °C y 210 rpm, hasta que los cultivos alcanzaron DO₆₀₀ entre 1 y 2, las células se mezclaron con una solución de glicerol estéril al 20 % (v/v) y se almacenaron a -80 °C.

Las células de *E. coli* transformadas con el vector pJRoC30 (conteniendo los diferentes mutantes) se sembraron en placas LB/amp *over night* (o/n) a 37 °C y colonias aisladas se transfirieron a tubos de 15 mL con 5 mL de LB/amp. Los tubos se incubaron a 37 °C y 210 rpm o/n, y se prepararon suspensiones celulares en glicerol estéril al 20 % (v/v). La suspensión celular se guardó a -80 °C hasta su uso.

3.2.6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.2.6.1. Análisis y cuantificación de ácidos nucleicos

En la determinación de la concentración de los ácidos nucleicos se utilizaron las siguientes técnicas:

- **Espectrometría ultravioleta-visible (UV-VIS):** se determinó la absorbancia a 260 nm de la solución de ácido nucleico a cuantificar (Sambrook *et al.*, 1989). La concentración se calculó teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 ng/μL de ADN de doble hebra. Además, una relación de absorbancia $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2$ indicó la pureza de la muestra.
- **Electroforesis analítica en geles de agarosa:** es una forma aproximada de calcular la concentración de ácidos nucleicos que permite, además, la separación y posterior purificación de fragmentos.

Los geles se realizaron a una concentración de agarosa de 75 g/L (0,75 % p/v) en tampón TAE y posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (2 μg/mL) durante 15-20 min. La visualización de las bandas se llevó a cabo con un transiluminador Gel Doc TM XR (Bio-Rad) con el software *Quantity One 1-D Analysis* (Bio-Rad). Las muestras se mezclaron con tampón de carga compuesto por azul de bromofenol 1 g/L, azul de xilencianol 1 g/L, EDTA 50 mM, pH 8,0 y glicerol 50 % (p/v). Las carreras de electroforésis se llevaron a cabo a un voltaje de 100 V en cubetas horizontales con geles sumergidos en tampón TAE.

La concentración de las bandas obtenidas en el gel se calculó comparando su intensidad con la de marcadores de tamaño y concentración conocidos.

3.2.6.2. Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de los distintos productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,75 % (p/v) a 4 °C y bajo un potencial de 60 V. La visualización de las bandas se llevó a cabo como se indica en el apartado anterior, incluyendo un paso previo de lavado del gel con agua destilada tras la tinción con bromuro de etidio. Las bandas de interés fueron extraídas del gel y purificadas con el kit *Zymoclean gel DNA recovery* siguiendo el manual de instrucciones del fabricante. Este método se basa en la unión del ADN a una matriz de sílice en presencia de altas concentraciones de sal y su elución a bajas concentraciones.

La purificación del plásmido lineal se realizó bajo las mismas condiciones expuestas anteriormente, pero usando geles de agarosa de bajo punto de fusión (0,75 % p/v).

3.2.6.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el software Fast-PCR 3.5.30 (*University of Helsinki*, Finlandia) y sintetizados por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid).

3.2.6.4. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias

Las secuencias de los diferentes clones mutados de la lacasa de *P. cinnabarinus* se obtuvieron según la estrategia *prime walking*, utilizando terminadores marcados en reacciones de amplificación con la enzima FS AmpliTaq ADN polimerasa. El equipo de secuenciación automática utilizado fue ABIPRISM 377 (Perkin Elmer) de Secugen, Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid).

Tabla 3.2. Oligonucleótidos empleados

Nombre	Secuencia	Sitio de unión en pJRoC30
RMLN directo	5' CCTCTATACTTTAACGTCAAGG 3'	pb 5'-160-181-3'
RMLC inverso	5' GGGAGGGCGTGAATGTAAGC 3'	pb 5'-2031-2050-3'
Lac 1	5' CGACGACACTGTCATTACGC 3'	pb 5'-905-924-3'
Lac 3	5' GGCTTCGTAGGAGTAGTC 3'	pb 5'-1361-1388-3'

El análisis de las secuencias se llevó a cabo con los programas BioEdit 7,0 y Chromas 1,4 para alineación y visualización de secuencias.

3.2.6.5. Linearización del vector pJRoC30

El vector pJRoC30 fue digerido con las enzimas BamHI y XhoI para ligarlo posteriormente a los genes de lacasa, tanto de la lacasa salvaje, como de las lacasas mutadas en los diferentes ciclos de evolución (Tabla 4.9). Con el objetivo de evitar un excesivo número de falsos positivos, para la linearización se empleó el vector pJRoC30 que contenía el gen nativo de la peroxidasa versátil (VP) de *Pleurotus eringii* y que carece de expresión funcional en *S. cerevisiae* en ausencia de H₂O₂.

Tabla 3.3. Condiciones de la reacción de digestión del plásmido pJRoC30

Tampón de digestión NE BamHI (10X)	2 µL
BSA (10 mg/mL)	2 µL
Plásmido pJRoC30 con el gen de VP	2-4 µg
BamHI	7.5 U
XhoI	7.5 U
Completar con agua milli Q hasta	20 µL

La reacción se incubó durante 5 h a 37 °C y posteriormente las enzimas fueron inactivadas a 80 °C durante 20 min.

3.2.6.6. Construcción de pJRoC30α-PcL

La secuencia señal de la lacasa nativa de *P. cinnabarinus* fue sustituida por la secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae*. La fusión del gen de la lacasa de *P. cinnabarinus* con la secuencia del pre-propéptido del factor α se realizó mediante su inserción en el vector pGAPZα que se utiliza habitualmente para expresión de proteínas en *P. pastoris* y que contiene dicha secuencia señal. Para ello, primero se linearizó el plásmido con EcoRI y con NotI, según las condiciones de la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Condiciones de la reacción de digestión del plásmido pGAPZα

Tampón de digestión H 10X	2 µL
Plásmido pGAPZα	1 µg
EcoRI	10 U
NotI	10 U
Completar con agua milli Q hasta	20 µL

La reacción se incubó durante 4 h a 37 °C y posteriormente las enzimas fueron inactivadas a 80 °C durante 20 min.

Posteriormente, el ADNc *lac1* de *P. cinnabarinus*, fue amplificado con los oligonucleótidos cebadores NEcoRI-directo y CNotI-inverso (ver Tabla 3.5) que incluyen dianas de restricción para EcoRI y NotI, generando un molde de la lacasa madura (PcL) que excluye la secuencia señal nativa (Tabla 3.6).

Tabla 3.5. Oligonucleótidos empleados

Nombre	Secuencia
NEcoRI-directo	5' CGGAATTCGCCATAGGGCCTGTGGCGG 3'
CNotI-inverso	5' AAGGAAAAAAGCGGCCGCTCAGAGGTCGCTGGGGTCAAGTGC 3'
NpJBglII-directo	5' GAAGATCTATGAGA TTCCTTCAATTTTACTGC 3'

Tabla 3.6. Condiciones de la reacción de amplificación de PcL

Oligonucleótido NEcoRI-directo	400 nM
Oligonucleótido CNotI-inverso	400 nM
dNTPs	1 mM ¹
Buffer Taq polimerasa(10X)	5 µL
Taq polimerasa	2,5 U
MgCl ₂	4 mM
Gen de lacasa molde n-PcL	25 ng
Completar con agua milli Q hasta	50 µL

¹0,25 mM de cada dNTP

El programa de PCR empleado fue: 94 °C durante 5 min, 55 °C durante 5 min, 72 °C durante 5 min (1 ciclo), 95 °C durante 0.35 min, 50 °C durante 2 min, 72 °C durante 4 min (25 ciclos), y 72 °C durante 10 min (1 ciclo).

PcL fue digerido con EcoRI y NotI y ligado al vector linearizado pGAPZα (Tabla 3.7), generando la construcción pGAPZα-PcL. Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico (Sambrook *et al.*, 2001) con dicho vector para hiperproducirlo.

Las células competentes DH5α se obtuvieron siguiendo el método del RbCl con el siguiente protocolo: a partir de un inóculo, obtenido por el crecimiento *o/n* a 37 °C de una colonia aislada de bacteria en medio LB, se sembró un matraz de medio *Ψ broth* y se incubó a 37 °C hasta que la DO₆₀₀ fue de 0,5. En ese momento, se tomó el cultivo y se centrifugó a 2.500 rpm durante 15 min a 4 °C, y el precipitado se resuspendió en 30 mL (por cada 100 mL de cultivo) de TFB1 enfriado en hielo. Las células se resuspendieron

cuidadosamente y se incubaron en hielo durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron como se describe arriba y, una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 4 mL (por cada 100 mL de cultivo) de TFB2 y se conservaron en alícuotas de 200 μ L a -80 °C hasta su uso.

Tabla 3.7. Condiciones de la reacción de ligación

Vector linealizado pGAPZ α	70 ng
Template de lacasa (PcL)	200 ng
Buffer de ligasa 10X	1 μ L
Ligasa	10 U
Completar con agua milli Q hasta	10 μ L

4 °C o/n

La purificación del plásmido pGAPZ α -PcL se llevó a cabo con el kit *Wizard Plus SV Minipreps* siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Posteriormente, a partir de pGAPZ α -PcL, se amplificó mediante PCR el fragmento formado por la secuencia del pre-propéptido del factor α y el gen de la lacasa (α -PcL) con ayuda de los oligonucleótidos NpJBglII-directo y CNotI-inverso (ver Tabla 3.5), los cuales incluyen dianas de restricción para BglII - compatible con BamHI - y NotI. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las que aparecen en la tabla 3.8.

Tabla 3.8. Condiciones de la reacción de amplificación de α -PcL

Oligonucleótido NpJBglII-directo	400 nM
Oligonucleótido CNotI-inverso	400 nM
dNTPs	0,25 mM
Buffer Taq polimerasa (10X)	5 μ L
Taq polimerasa	2,5 U
MgCl ₂	4 mM
pGAPZ α -PcL	25 ng
Completar con agua milli Q hasta	50 μ L

El programa de PCR empleado fue: 94 °C durante 5 min, 55 °C durante 5 min, 72 °C durante 5 min (1 ciclo), 95 °C durante 0.35 min, 50 °C durante 2 min, 72 °C durante 4 min (25 ciclos), y 72 °C durante 10 min (1 ciclo).

α -PcL fue digerido con BglII y NotI y ligado al plásmido pJRoC30 previamente linearizado de acuerdo con el apartado 3.2.6.5 (Figura 3.2).

Debido a la estrategia de clonación utilizada, en el extremo amino terminal de la proteína aparecen dos aminoácidos extras (E-F) tras el procesamiento del péptido señal. Las mutaciones introducidas en la proteína madura durante el proceso evolutivo mantienen la numeración descrita para la lacasa madura de *P. cinnabarinus* nativa.

Tabla 3.9. Condiciones de la reacción de ligación

Vector de expresión linealizado pJRoC30	90 ng
α -PcL	200 ng
Buffer de ligasa 10X	1 μ L
Ligasa	10 U
Completar con agua milli Q hasta	10 μ L

4 °C o/n

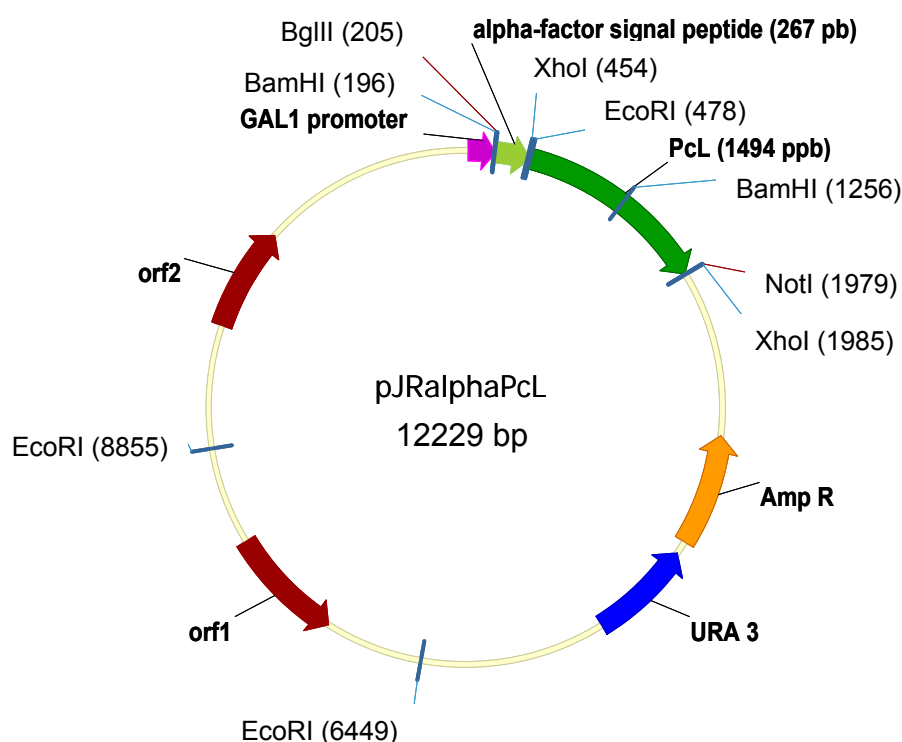


Figura 3.2. Plásmido pJRoC30αPcL.

3.2.7. DESARROLLO DEL PROTOCOLO DE *HIGH-THROUGHPUT SCREENING*

3.2.7.1. Transformación de células de *S. cerevisiae*

Las genotecas obtenidas en los diferentes ciclos evolutivos (ver apartado 3.2.8) se transformaron en células de *S. cerevisiae* utilizando el kit de transformación *Yeast Transformation Kit* (Sigma) (Bulter *et al.*, 2003a). Se incubaron colonias aisladas de células silvestres de *S. cerevisiae* en 20 mL de medio YPD líquido a 30 °C y 210 rpm en un agitador orbital (Edmund Bühler GMBH SM-30) *o/n*, hasta alcanzar una DO₆₀₀ superior a 2. Una cantidad adecuada del cultivo se inoculó en un volumen total de 100 mL de YPD para alcanzar una DO₆₀₀ de 0,3 y se incubó de nuevo durante 4-6 h, hasta completar dos ciclos de crecimiento y alcanzar una DO₆₀₀ de 1,2. Las células se transformaron con las correspondientes genotecas en presencia del plásmido pJRoC30 linealizado, en proporción 4:1, con el kit de transformación de levadura. Para aumentar la eficiencia de transformación se añadió DMSO a la mezcla (concentración final de 10 % v/v), inmediatamente antes del choque térmico establecido en el protocolo.

3.2.7.2. Optimización de las condiciones de inducción en microcultivos

Se estudió el efecto de la adición de etanol, cobre, ácido ferúlico y vainillina en el crecimiento de *S. cerevisiae* y en la producción de lacasa por la levadura (Eggert *et al.*, 1996b; Lee *et al.*, 1999; Lomascolo *et al.*, 2003; Hoshida *et al.*, 2005).

Un único transformante de *S. cerevisiae* conteniendo el gen de la lacasa de *P. cinnabarinus* se seleccionó y se creció en placas con medio mínimo durante 3-4 días a 30 °C. Colonias individuales de dicho clon se inocularon en placas de 96 pocillos (Sero-well) que contenían 50 µL de medio mínimo líquido por pocillo. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron en un incubador Minitron-INFORS (Biogen) a 30 °C, 210 rpm y 80 % de humedad relativa para evitar la evaporación de los pocillos. Tras 48 h, se añadieron 160 µL de medio de expresión conteniendo 10 µM, 250 µM, 1 mM, 2 mM ó 4 mM de CuSO₄. A las diferentes concentraciones de CuSO₄ presentes en el medio de expresión se añadió 25 g/L de etanol y 250 µM de ácido ferúlico o vainillina como inductores (Figura 3.3). Después de 5 días de cultivo se realizó el *screening* de actividad lacasa con ABTS y DMP según se indica en

el apartado 3.2.7.3.1. Cada valor se obtuvo de la media de cinco microcultivos.

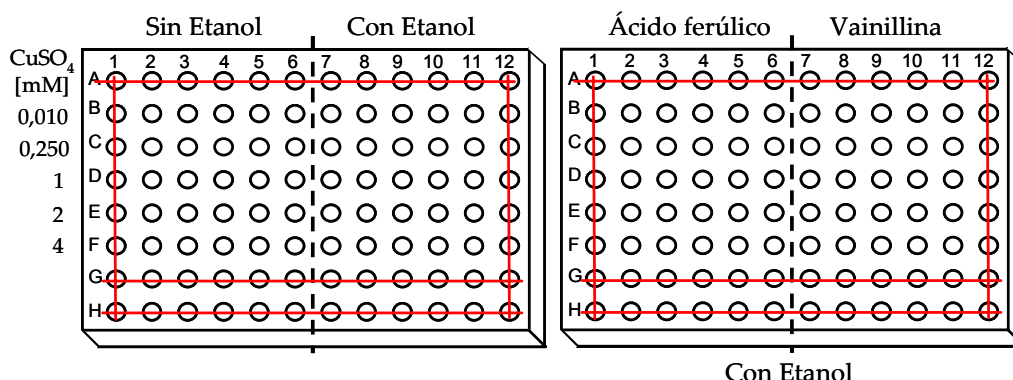


Figura 3.3. Ensayo de optimización de las condiciones de inducción.

3.2.7.3. Preparación de las librerías para *High-Throughput Screening* (HTP)

Las células de *S. cerevisiae* transformadas con la correspondiente genoteca y el vector pJRoC30 linearizado se sembraron en placas con medio mínimo y se incubaron como se indica en el apartado anterior. La columna completa número 6 de cada placa se inoculó con el tipo parental de forma que fuese la columna de referencia, y uno de los pocillos (H1) no se inoculó para que sirviese de blanco con medio de cultivo únicamente. El medio de expresión añadido a los pocillos contuvo 25 g/L de etanol y 2 mM de CuSO_4 . Tras 5 días de incubación en la primera generación, y 24 h en las siguientes, se centrifugaron las placas durante 5 min a 3200 g y 4 °C en una centrífuga *Eppendorf* 5810R. Posteriormente, 20 μL del sobrenadante de cada pocillo fueron transferidos desde la placa maestra a cada una de las placas réplica mediante un robot manipulador de líquidos Quadra 96-320 (Tomtec).

3.2.7.3.1. Ensayos colorimétricos

Screening de actividad: el ensayo sistemático de actividad lacasa se realizó por duplicado frente a un sustrato no fenólico (ABTS) y a otro fenólico (DMP). En ambos casos se añadieron sobre la placa réplica (conteniendo 20 μL de sobrenadante) 180 μL de sustrato en concentración final 3 mM en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 con la ayuda del robot y se agitaron las placas brevemente. La absorbancia inicial de las muestras a 418 y 469 nm para el ABTS y DMP, respectivamente, se midió de forma inmediata en un lector de placas Versa Max (Molecular Devices). Posteriormente, se incubaron las placas a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que se desarrolló el color verde del radical catiónico del

ABTS (ϵ_{418} 36.000 M⁻¹cm⁻¹) o el color naranja del DMP oxidado (ϵ_{469} 27.500 M⁻¹cm⁻¹) (Figura 3.4). Las actividades se calcularon a partir de la diferencia entre las absorbancias final e inicial en cada pocillo. Las actividades relativas se normalizaron con respecto a la actividad del tipo parental de la placa correspondiente.

Aquellos mutantes seleccionados que mostraron mayor actividad frente a ABTS o frente a DMP fueron sometidos a dos *re-screenings* consecutivos:

Primer *re-screening*: alícuotas de 5 μ L de los clones seleccionados se inocularon en placas multipocillo con 50 μ L de medio mínimo. Las columnas y filas de los extremos de la placa (columnas 1 y 12, filas A y H) no se utilizaron para evitar problemas de evaporación. Tras 24 h de incubación a 30 °C y 210 rpm, se transfirieron 5 μ L a los 4 pocillos adyacentes incubándose en las mismas condiciones que los anteriores. Posteriormente se añadió 160 μ L de medio de expresión y se incubaron las placas durante 5 días en la primera generación y 24 h en las siguientes, a 30 °C y 210 rpm. Con el parental se procedió de la misma manera situándose en la fila D en los pocillos 7-11. Las placas se sometieron al mismo protocolo de *screening* que en el caso anterior, con la salvedad de que cada valor de actividad procedió de la media de 4 microcultivos por clon (Figura 3.4).

Segundo *re-screening* de actividad: alícuotas de 100 μ L de los clones más activos del primer *re-screening* se crecieron en 3 mL de YPD a 30 °C y 210 rpm durante 24 h. Se extrajeron los plásmidos de estos cultivos (*Zymoprep yeast plasmid miniprep kit*). Como el producto de las *zymoprep* no fue de la pureza necesaria y la concentración del ADN extraído fue muy baja, se transformaron los plásmidos en células de *E. coli* supercompetentes XL2-blue según el protocolo correspondiente (Stratagene) y se seleccionaron en placas LB/amp. Colonias aisladas se inocularon en 5 mL de medio LB/amp y se crecieron *o/n* a 37 °C. Se extrajeron los plásmidos (*QIAprep spin miniprep kit*) y se transformaron células de *S. cerevisiae* con los mejores mutantes así como con el correspondiente tipo parental. El ensayo colorimétrico se llevó a cabo de la misma manera que en casos anteriores, pero cada valor de actividad procedió de la media de 5 microcultivos por clon (Figura 3.5).

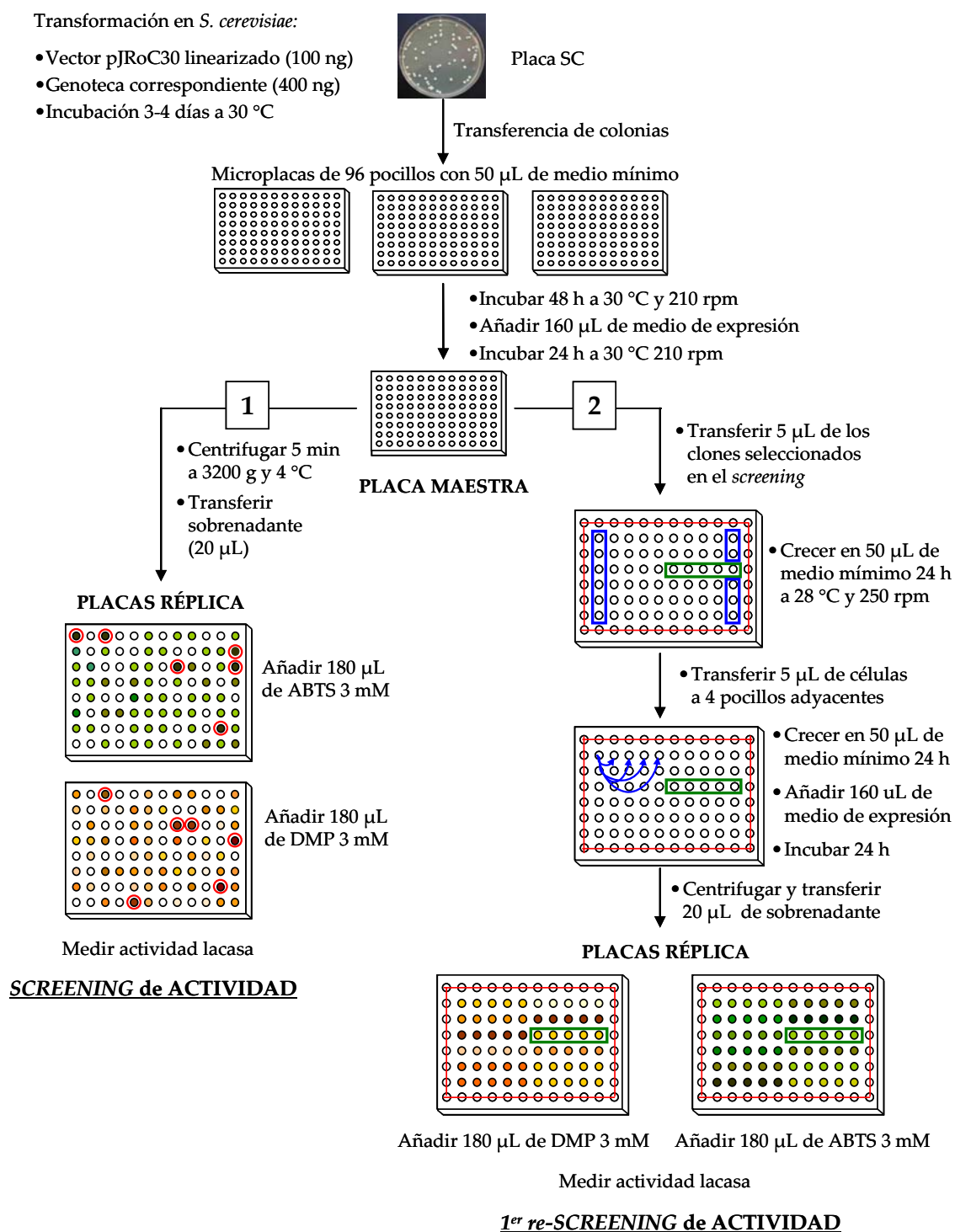


Figura 3.4. Esquema del protocolo de ensayo sistemático de exploración y selección de actividad lacasa (*high-throughput screening* y primer *re-screening*). El recuadro verde corresponde a los pocillos con la lacasa parental y el azul representa la forma de transferencia de colonias a la placa.

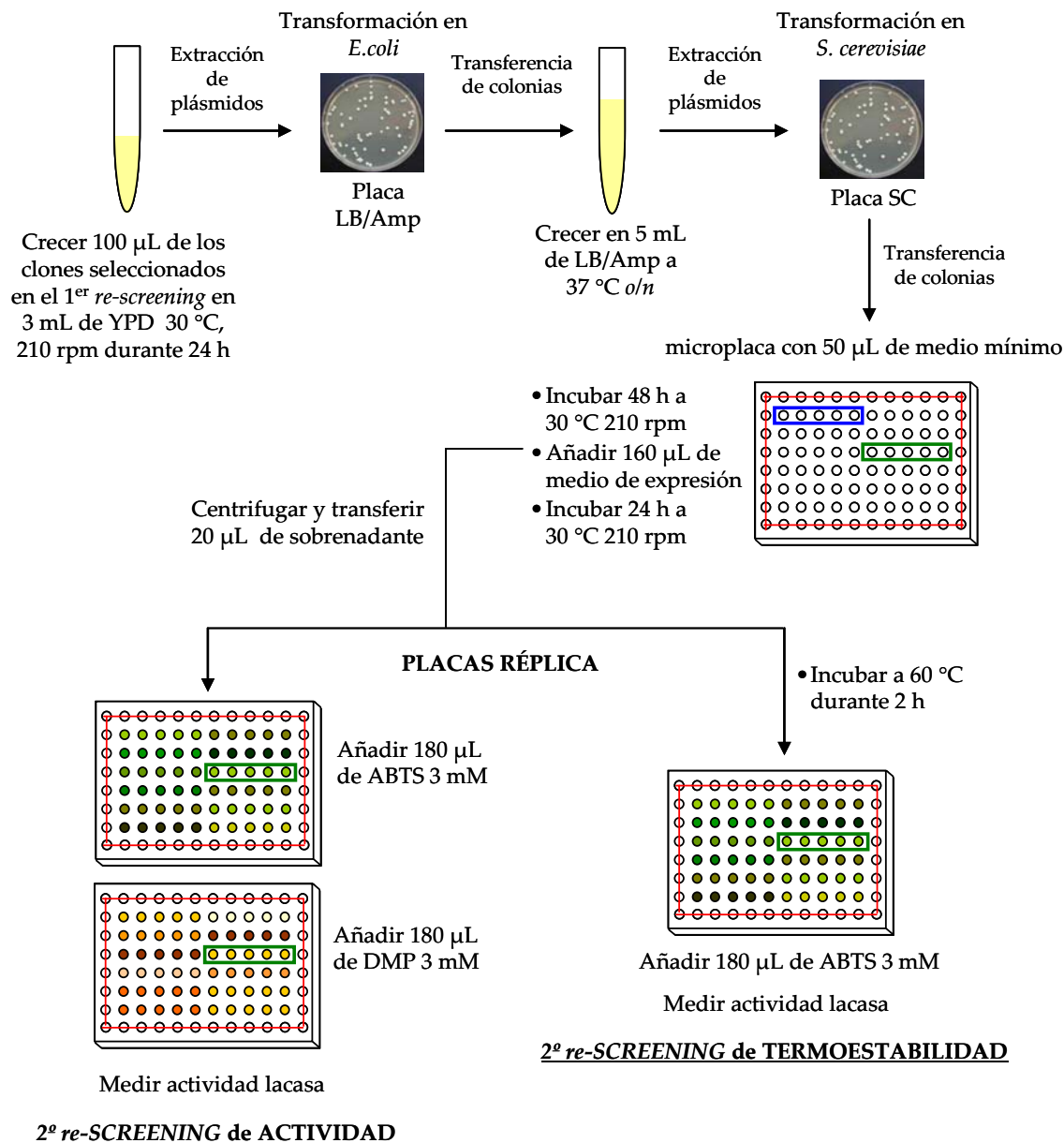


Figura 3.5. Esquema del protocolo del segundo re-screening. El recuadro verde corresponde a los pocillos con la lacasa parental y el azul representa la forma de transferencia de colonias a la placa

En la primera generación se realizó un **Segundo re-screening de termoestabilidad** paralelo, de la siguiente manera: La placa réplica con 20 μ L de sobrenadante se selló (*sealplate tape Whatman uniseal 7704-0001*) y se incubó durante 2 h a 60 °C. Transcurrido este tiempo se añadieron 180 μ L de ABTS 3 mM en acetato sódico 100 mM pH 5,0 y se sometieron al mismo protocolo descrito anteriormente. La actividad residual se calculó en base a las actividades iniciales correspondientes al segundo re-screening de actividad (Figura 3.5).

3.2.8. PROCESO DE EVOLUCIÓN DE LA LACASA DE *P. cinnabarinus*

La mutagénesis al azar del ADNc *lac1* (PcL) se indujo mediante PCR-mutagénica en un termociclador de gradiente (*Thermocycler Mycycler*, Biorad) bajo los siguientes parámetros de reacción: 95 °C durante 2 min (1 ciclo), 94 °C durante 0.45 min, 53 °C durante 0.45 min, 74 °C durante 3 min (28 ciclos), y 74 °C durante 10 min (1 ciclo). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación mutagénica fueron RMLN directo y RMLC inverso (ver Tabla 3.2). El empleo de estos nucleótidos promovió la ligación *in vivo* de los productos amplificados por PCR, gracias al diseño de sendas extensiones en los extremos con una homología de 40 pb y 66 pb, respectivamente, con los extremos digeridos con BamHI y XhoI del vector pJRoC30 linearizado.

En cada una de las generaciones, los correspondientes productos de PCR fueron cargados en un gel semipreparativo de agarosa y purificados con el kit *Zymoclean gel DNA recovery*. Los productos de PCR fueron posteriormente clonados en las células de *S. cerevisiae* mediante la transformación *in vivo* en presencia del vector previamente linearizado.

3.2.8.1. Condiciones de PCR mutagénica

• Genotecas con Mutazima II:

El índice de mutación se moduló variando la cantidad de ADN molde en la reacción de PCR. Se crearon dos genotecas, una de bajo (entre 0 y 4,5 mutaciones por cada 1000 bp) y otra de medio índice de mutación (entre 4,5 y 9 mutaciones por cada 1000 bp).

Tabla 3.10. Composición de la reacción de PCR mutagénica

Oligonucleótido RMLN directo	185 nM
Oligonucleótido RMLC inverso	185 nM
dNTPs	0,8 mM ³
DMSO	3 % (v/v)
Buffer Mutazima (10X)	5 µL
Mutazima ADN polimerasa II	2,5 U
ADNc de lacasa molde	4,65 µg ¹ o 2 µg ²
Completar con agua milli Q hasta	50 µL

¹Bajo índice de mutación.

²Medio índice de mutación.

³0,2 mM de cada dNTP.

• **Genotecas con Taq polimerasa/MnCl₂:**

La tasa de mutación se controló variando la concentración de MnCl₂ y utilizando dNTPs balanceados.

Tabla 3.11. Composición de la reacción de PCR mutagénica

Buffer Taq (10X)	5 µL
DMSO	3 % (v/v)
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM
dNTPs	0,3 mM ¹
ADNc de lacasa molde	4,6 ng
Oligonucleótido RMLN directo	90 nM
Oligonucleótido RMLC inverso	90 nM
MnCl ₂	0,01 mM
Taq polimerasa	2,5 U
Completar con agua milli Q hasta	50 µL

¹0,075 mM de cada dNTP

3.2.8.2. Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima II

Usando como parental la secuencia α -PcL, se construyeron y exploraron dos genotecas de 1000 mutantes de cada una, una de bajo y otra de medio índice de mutación (Tabla 3.10).

Para cada genoteca las mezclas de transformación en *S. cerevisiae* contenían 400 ng de producto de cada librería y 100 ng de plásmido pJRoC30 linearizado (relación vector:producto de PCR 1:4). Del mismo modo se transformaron células competentes de *S. cerevisiae* con la construcción α -PcL, en presencia del plásmido linearizado, para su uso como parental.

El ensayo sistemático de actividad (punto final) se desarrolló de acuerdo con el apartado 3.2.7.3.1, con ABTS y DMP. En esta generación se realizó un segundo *re-screening* adicional de termoestabilidad utilizando ABTS como sustrato.

3.2.8.3. Segunda generación: PCR mutagénica con Taq/MnCl₂ y barajado *in vivo* de ADN

Los mejores mutantes de la primera generación se tomaron como parentales para un nuevo ciclo de evolución mediante mutagénesis inducida con Taq/MnCl₂ según las condiciones indicadas en la tabla 3.11, y

posterior recombinación de estos productos en la levadura (barajado *in vivo* de ADN).

150 ng de cada uno de los productos de PCR mutagénica (600 ng totales) se mezclaron con 150 ng del vector linearizado (relación vector:producto de PCR 1:4) y se transformaron en *S. cerevisiae*. Se exploraron cerca de 2000 clones de esta genoteca en el ensayo sistemático de actividad (*HTP screening*), en el que se tomó la actividad del mejor mutante de la primera generación como referencia (parental), por lo que se transformaron también células de *S. cerevisiae* con este mutante. El *screening* de punto final se desarrolló de acuerdo con el apartado 3.2.7.3.1.

3.2.8.4. Tercera generación: PCR mutagénica con Taq/MnCl₂ y barajado *in vivo* de ADN

Los mutantes seleccionados de la segunda generación fueron sometidos a un nuevo ciclo de evolución mediante PCR mutagénica con Taq/MnCl₂, para posteriormente recombinar estos productos mediante barajado *in vivo* de ADN. Las condiciones utilizadas en la PCR propensa a error fueron las mismas que las empleadas en la segunda generación (Tabla 3.11). Se transformaron células de *S. cerevisiae* con 150 ng de cada uno de los 6 productos de PCR mutagénica (900 ng totales) y 225 ng del vector linearizado, manteniendo así la relación vector:producto de PCR en 1:4. Se exploraron unos 2000 clones de la genoteca construida.

Además, se transformó *S. cerevisiae* de manera independiente con el mejor mutante de la segunda generación, para ser utilizado como referencia (parental) en el ensayo sistemático colorimétrico de actividad, de acuerdo con el apartado 3.2.7.3.1, con ABTS y DMP como sustratos.

3.2.9. MUTAGÉNESIS DE LOS RESIDUOS R(α2)S Y A240P MEDIANTE IVOE

La introducción de mutaciones puntuales se llevó a cabo mediante la estrategia de *In Vivo Overlap Extension* (IVOE) (Alcalde *et al.*, 2006) que consiste en crear dos o más productos de PCR a partir de oligonucleótidos que contienen la mutación en la posición o posiciones sometidas a estudio, para posteriormente facilitar su recombinación *in vivo* durante la transformación en *S. cerevisiae*, junto con el plásmido linearizado.

El mejor mutante de la tercera generación fue sometido a mutagénesis en la posición 2 del factor α , situada en el prepeptido para sustituir el aminoácido Arg por Ser y en la posición 240 de la proteína madura para reemplazar Ala por Pro.

La transformación en la levadura se realizó mezclando 200 ng de cada uno de los dos productos de PCR con 100 ng de vector pJRoC30 linearizado (relación vector: productos de PCR 1:4), según el protocolo del apartado 3.2.7.1. Posteriormente se exploró una librería de aproximadamente 400 clones con el fin de detectar posibles combinaciones (mutación R(α 2)S, mutación A240P o ambas) que resultasen beneficiosas.

El *screening* de actividad se realizó con ABTS 3 mM en tampón acetato sódico pH 5,0, según el apartado 3.2.7.3.1.

Tabla 3.12. Mezcla para las reacciones de PCR 1 y 2

<i>Pfu Ultra</i>	2,5 U
Buffer <i>Pfu Ultra</i> (10X)	5 μ L
DMSO	3 % (v/v)
Gen del mutante 7A9	100 ng
dNTPs	1 mM ³
Oligonucleótido RMLN directo y 3SA240P inverso ¹	0,25 μ M
Oligonucleótido RMLC inverso y 2SPREAL directo ²	0,25 μ M
Completar con agua milli Q hasta	50 μ L

¹ Oligonucleótidos empleados para la reacción de PCR 1.

² Oligonucleótidos empleados para la reacción de PCR 2.

³ 0,25 mM de cada dNTP.

Los parámetros de la reacción de PCR fueron los siguientes: 95 °C durante 2 min (1 ciclo); 94 °C durante 0.45 min, 55 °C durante 0.45 min, 74 °C durante 2 min (28 ciclos); y 74 °C durante 10 min (1 ciclo).

Tabla 3.13. Oligonucleótidos empleados

Nombre	Secuencia
RMLN directo	5' CCTCTATACTTTAACGTCAAGG 3'
3SA240P inverso	5' GCACGAAGGAGTAGCGCTGCGCAGGAAAAATCTGGATTGAATC 3'
2SPREAL directo	5' GGATCCATAAGATCTATGAGTTTTTCCTTCAATTTTTACTGC 3'
RMLC inverso	5' GGGAGGGCGTGAATGTAAGC 3'

3.2.10. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA VARIANTE 7A9

3.2.10.1. Optimización de las condiciones de producción

3.2.10.1.1. Efecto de la concentración de cobre

Se cultivaron las células de *S. cerevisiae* transformadas con el mutante 7A9 en 3 mL de medio mínimo durante 48 h, a 30 °C y 250 rpm (Micromagmix shaker, Ovan). Una alícuota de este precultivo se inoculó para alcanzar una DO₆₀₀ de 0,25 en un volumen total de 1 mL de medio mínimo. Cuando se completaron dos ciclos de crecimiento (DO₆₀₀ = 1, 6-8 h de incubación) se añadieron 9 mL de medio de expresión conteniendo 25 g/L de etanol y 1, 2, 3, 4, 6, 8 ó 13 mM CuSO₄ en matraces de 100 mL con tampón poroso. Se incubaron a 30 °C y 250 rpm durante 48 h, tomando lecturas de actividad y de DO₆₀₀ hasta alcanzar la fase estacionaria. La actividad lacasa se midió con ABTS 3 mM en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0.

3.2.10.1.2. Efecto de la temperatura

Los transformantes de *S. cerevisiae* productores de la variante 7A9 fueron cultivados de forma análoga a lo descrito en el apartado anterior durante 48 h. Una alícuota del precultivo se inoculó para alcanzar una DO₆₀₀ de 0,25, esta vez en un volumen total de 20 mL de medio mínimo. Cuando se completaron dos ciclos de crecimiento se añadieron 180 mL de medio de expresión conteniendo 25 g/L de etanol y 4mM de CuSO₄ en matraces de 2 L con tampón poroso. Se incubaron a 20 y 30 °C y 250 rpm, tomando lecturas de actividad y DO₆₀₀ hasta alcanzar la fase estacionaria. La actividad lacasa se detectó con ABTS 3 mM en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0.

3.2.10.2. Producción de la variante 7A9

El protocolo seguido para la producción de lacasa fue el descrito en el apartado anterior, seleccionando la concentración final de 4 mM de CuSO₄ y la temperatura de 20 °C. El cultivo se paró tras 5 días de incubación, cuando tanto el crecimiento celular como la actividad lacasa se estacionaron (DO₆₀₀ 35; actividad lacasa 40 U/L).

El cultivo se centrifugó a 4 °C y 13.000 rpm durante 15 minutos.

3.2.10.3. Purificación de la variante 7A9

1. El sobrenadante obtenido en el apartado anterior se concentró por **ultrafiltración tangencial**. La muestra se hizo pasar a través de una membrana de 5 kDa de tamaño de poro (Minisette, Filtron) mediante un flujo proporcionado por una bomba peristáltica (Masterflex easy-load, Cole-Palmer).
2. Se realizó un segundo paso de concentración mediante **ultrafiltración bajo presión** (ejercida con nitrógeno) con membrana de 3 kDa de tamaño de poro (Amicon YM3, Millipore).
3. El concentrado se dializó en tampón A (acetato sódico 25 mM, pH 5,0) previamente a la **cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución**. Para ello se utilizó un cartucho HiTrap-Q (Amersham Biosciences) acoplado a un equipo EconoSystem (Bio-Rad). Tras equilibrar el cartucho con solución A se aplicó la muestra y se lavó la columna con la misma solución para eliminar toda la fracción no retenida, hasta que la absorbancia a 280 nm fue constante. La fracción retenida se eluyó con un gradiente en dos fases de solución B (NaCl 1 M en tampón acetato sódico 25 mM, pH 5,0), de 0 a 20 % en 45 min y de 20 a 100 % en 5 min, a un flujo de 1 mL/min.
4. De nuevo, las fracciones con actividad lacasa se dializaron en tampón A como paso previo a la última fase de purificación basada en **cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución**. Se utilizó una columna *Resource Q* (Amersham Biosciences) acoplada a un equipo AKTApurifier (Amersham Biosciences). Se equilibró la columna con solución A y la fracción retenida se eluyó con un gradiente en dos fases con solución B, de 0 a 20 % en 20 min y de 20 a 100 % en 10 min, a un flujo de 2 mL/min.
5. Finalmente, las fracciones con actividad lacasa se dializaron frente a acetato sódico 25 mM, pH 5,0 y se concentraron mediante ultrafiltración bajo presión con membrana de 3 kDa. La proteína pura se almacenó a -20 °C.

3.2.11. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA VARIANTE 7A9

3.2.11.1. Electroforesis SDS-PAGE y desglicosilación

La proteína purificada se desglicosiló con la enzima péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F), que hidroliza los oligosacáridos unidos a los residuos de Asp. Concretamente, 8 μ g de lacasa pura se desnaturalizaron con SDS 0,2 % (p/v) y β -mercaptoetanol 100 mM, a 100 °C durante 10 min. Posteriormente se añadieron 2,5 U de PNGasa F y la mezcla de reacción se incubó *o/n* a 37 °C. La reacción se paró a 100 °C durante 10 min. Los productos se analizaron en un gel de electroforesis (SDS-PAGE) al 7,5 % (p/v) teñido con azul de *Coomassie*. Se utilizó una solución *stock* de acrilamida al 29,2 % (p/v) y bisacrilamida al 0,8 % (p/v). El tampón de carrera fue tris-glicina (0,25 M de tris base, 2 M de glicina, pH 8,8) con SDS al 0,1 % (p/v). Las carreras se desarrollaron a 100 V en un equipo Mini-PROTEAN III de Bio-Rad. Para conseguir las condiciones desnaturalizantes se hirvieron las muestras durante 5 min con tampón de carga y β -mercaptoetanol (1,45 g/L Tris-HCl, pH 8,5; 20 mL/L glicerol; 0,4 g/L SDS; 0,1 g/L azul de bromofenol; y 5 % (v/v) de β -mercaptoetanol) en relación 4:1. Para calcular la masa molecular, se comparó la banda obtenida para la muestra con los correspondientes patrones de masa molecular (*High Range Molecular Weight Standards* de Bio-Rad).

La tinción de los geles se realizó sumergiéndolos durante 30 min en una solución de azul *Coomassie* R-250 que contenía 40 % de metanol (v/v), 10 % de ácido acético (v/v) y 0,1 % de azul *Coomassie* R-250 (p/v). Posteriormente, los geles se lavaron sucesivas veces en una solución de metanol-acético en agua (40 % metanol, (v/v), 10 % ácido acético (v/v)) para eliminar el colorante no fijado a las bandas de proteína.

3.2.11.2. Cálculo de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , k_{cat} y k_{cat}/K_m) de la oxidación de ABTS (ϵ_{418} 36.000 M⁻¹ cm⁻¹) y DMP (ϵ_{469} 27.500 M⁻¹ cm⁻¹) por las enzimas nativa y mutante se determinaron en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 a 25 °C, en un lector de microplacas Versa Max (Molecular Devices). Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados del modelo de Michaelis-Menten utilizando el programa informático SigmaPlot 7.101. Cada dato experimental se obtuvo a partir de la media de tres experimentos independientes.

3.2.11.3. Estabilidad frente a temperatura

El estudio de termoestabilidad se realizó con ayuda del termociclador *Mycycler* equipado con un formador de gradientes (Bio-Rad), el cual permite crear gradientes de temperatura a diferentes intervalos. Se prepararon diluciones de las proteínas en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 de tal manera que alícuotas de 10 μ L dieran una respuesta adecuada para medir la actividad en el lector de microplacas en modo cinético. Se incubaron 60 μ L de lacasa por cada punto del gradiente. El gradiente de temperatura estudiado comprendió el intervalo 30-80 °C con temperaturas intermedias de 30,0 °C, 31,7 °C, 34,8 °C, 39,3 °C, 45,3 °C, 49,9 °C, 53 °C, 55 °C, 56,8 °C, 59,9 °C, 64,3 °C, 70,3 °C, 75,0 °C, 78,1 °C y 80,0 °C. A diferentes tiempos de incubación (2, 4 y 24 h) se extrajeron alícuotas de 10 μ L de lacasa y se mezclaron con 190 μ L de de ABTS 3 mM en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0. La actividad se valoró en continuo (oxidación de ABTS a 418 nm). Las actividades se relacionaron con la actividad inicial a temperatura ambiente. Cada valor procedió de tres medidas independientes.

3.2.11.4. pH óptimo

Los perfiles de pH de la actividad de las lacasas (nativa y obtenida por evolución) se realizaron en tampón Britton y Robinson 100 mM en un rango de pH entre 2,0 y 9,0 (ajustados con NaOH). Se prepararon diluciones de las enzimas en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 para que alícuotas de 10 μ L dieran una respuesta de actividad adecuada durante la medida en el lector de microplacas en modo cinético. Las lacasas (10 μ L) se añadieron por filas y el tampón a diferentes pHs (180 μ L) por columnas. Finalmente, se añadieron 10 μ L de ABTS 60 mM y se midieron las actividades de cada una de las condiciones por triplicado.

4. Resultados

4.1. MEDIADORES REDOX DE LACASA DE ORIGEN NATURAL

4.1.1. PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS RELACIONADOS CON LA LIGNINA

4.1.1.1. Efecto sobre el crecimiento de *P. cinnabarinus* en placa

Se ensayó el efecto de cinco compuestos fenólicos: acetosiringona, siringaldehído, ácido sinápico, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico en el crecimiento del hongo *P. cinnabarinus*. Los resultados se muestran en porcentaje relativo a la colonización total de la placa por el hongo, alcanzada tras 13 días de incubación (control).

De todos ellos, ninguno resultó ser tóxico para el hongo en las concentraciones ensayadas. Los ácidos *p*-hidroxicinámicos, ácido sinápico, ferúlico y *p*-cumárico, resultaron ser inductores del crecimiento de *P. cinnabarinus*, incrementando un 15 % dicho crecimiento con respecto al crecimiento del hongo en su ausencia. Únicamente la concentración más alta de ácido ferúlico ensayada no promovió el crecimiento.

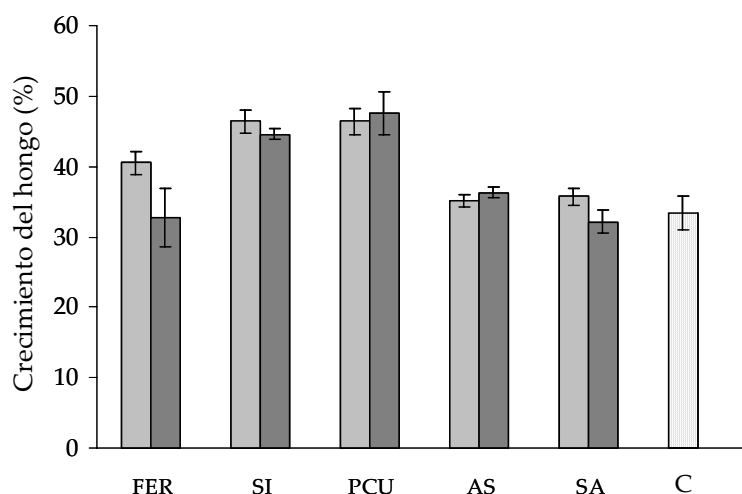
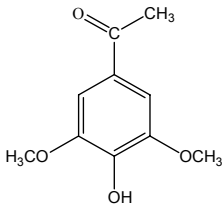
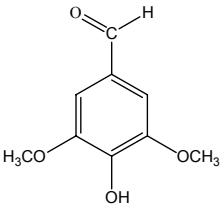
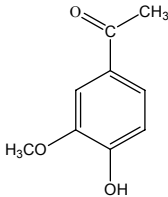
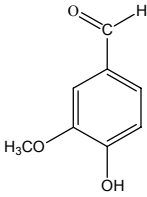
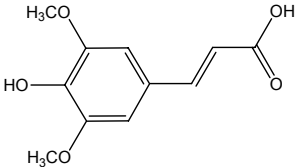
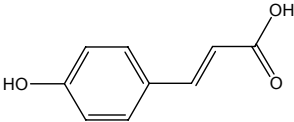
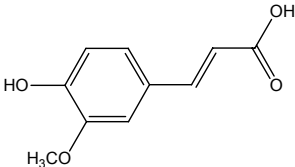
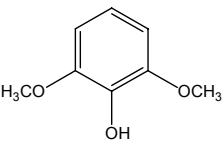
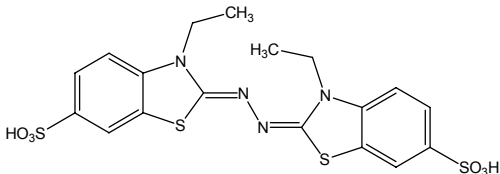
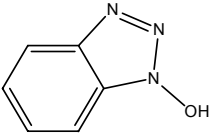


Figura 4.1 Efecto de la adición de ácido ferúlico (FER), sinápico (SI), *p*-cumarico (PCU), acetosiringona (AS) y siringaldehído (SA) en dos concentraciones diferentes (250 μ M \square y 1 mM \blacksquare) en el crecimiento de *P. cinnabarinus* tras 6 días de cultivo. Cultivo del hongo en ausencia de compuestos añadidos \square (C).

Tabla 4.1. Estructura de los compuestos fenólicos relacionados con la lignina, ensayados como mediadores redox de lacasa en esta tesis. Se incluyen también las estructuras de ABTS, DMP y HBT.

 <p>Acetosiringona</p>	 <p>Siringaldehído</p>
 <p>Acetovainillona</p>	 <p>Vainillina</p>
 <p>Ácido sinápico</p>	 <p>Ácido p-cumárico</p>
 <p>Ácido ferúlico</p>	 <p>2,6-Dimetoxifenol (DMP)</p>
 <p>ABTS</p>	 <p>1-Hidroxibenzotriazol (HBT)</p>

4.1.1.2. Caracterización como sustratos de lacasa

Se calcularon las cinéticas de oxidación por la lacasa de *P. cinnabarinus* de los compuestos fenólicos relacionados con la lignina (Tabla 4.2) y se compararon con las constantes obtenidas para dos sustratos típicos de lacasa: ABTS y 2,6-dimetoxifenol (DMP).

El ácido sinápico fue rápidamente oxidado por la lacasa, siendo la eficiencia (k_{cat}/K_m) de la lacasa para este compuesto 15 veces mayor que la encontrada para el ABTS y 2 veces mayor que para el DMP. El ácido ferúlico resultó ser el segundo mejor sustrato de la lacasa de entre todos los compuestos fenólicos ensayados, con una eficiencia unas 6 veces mayor que para el ABTS, y ligeramente inferior a la del DMP.

Aunque con ligeras diferencias, tanto acetosiringona como siringaldehído también fueron mejores sustratos de lacasa que el ABTS.

La lacasa de *P. cinnabarinus* presenta eficiencias similares para el ácido *p*-cumárico, la vainillina y la acetovainillona.

Tabla 4.2. Constantes cinéticas de la oxidación de los compuestos fenólicos relacionados con la lignina por la lacasa de *P. cinnabarinus*, comparadas con las de ABTS y DMP.

	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Ácido <i>p</i> -cumárico	88,1	0,8	0,01
Ácido ferúlico	7,4	13,0	1,77
Ácido sinápico	5,4	24,6	4,54
Acetosiringona	29,3	17,2	0,59
Siringaldehído	68,3	23,0	0,34
Vainillina	18,3	0,9	0,05
Acetovainillona	101,3	2,7	0,03
ABTS	18,7	5,5	0,29
DMP	3,6	8,7	2,43

4.1.1.3. Capacidad antioxidante

Las actividades antioxidantes de los compuestos fenólicos relacionados con la lignina fueron evaluadas a través de su capacidad para “secuestrar” el radical ABTS \bullet^+ (generado químicamente) y expresadas como valores

TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a la de Trolox). Se incluyó el mediador artificial HBT en la comparación.

La capacidad antioxidante fue ensayada en etanol y PBS (pH 7,4), como medios habituales, y también en citrato sódico (pH 5,0) para determinar las actividades antioxidantes de los fenoles relacionados con la lignina bajo las condiciones utilizadas en las reacciones con lacasa-mediador.

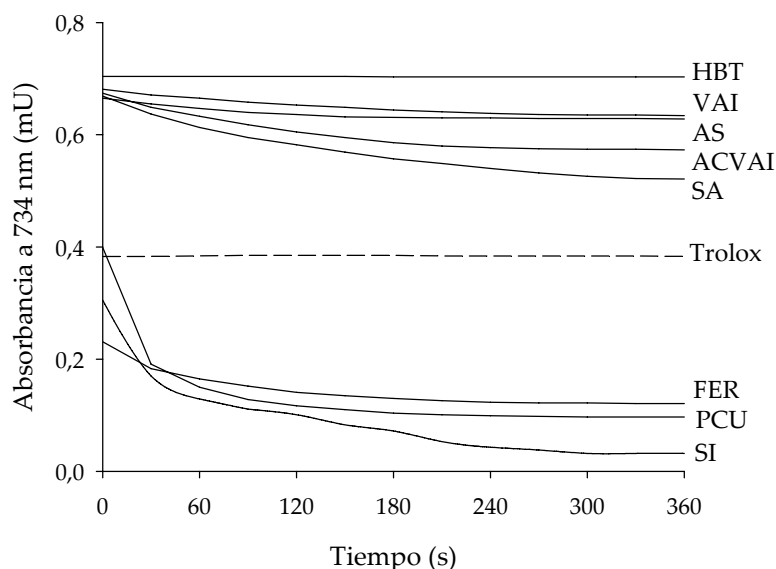


Figura 4.2. Actividades antioxidantes de diferentes compuestos fenólicos relacionados con la lignina (12,5 μ M): acetosiringona (AS), siringaldehído (SA), vainillina (VAI), acetovainillona (ACVAI), ácido *p*-cumárico (PCU), ácido ferúlico (FER) y ácido sinápico (SI), comparadas con las del Trolox y el HBT, determinadas por el descenso de absorbancia a 734 nm, debido a la reducción del ABTS $^{\bullet+}$ en citrato sódico pH 5,0.

Los resultados obtenidos en citrato sódico pH 5,0 ponen de manifiesto la existencia de dos grupos diferenciados de compuestos en cuanto a su capacidad antioxidante (Figura 4.2); de un lado, los ácidos *p*-hidroxicinámicos, con mayor poder antioxidante que el antioxidante de referencia Trolox y de otro lado, el resto de compuestos fenólicos ensayados (el HBT carece totalmente de esta capacidad).

El ácido sinápico mostró el mayor valor TEAC en los tres medios ensayados, seguido por el ácido ferúlico (Tabla 4.3). El ácido *p*-cumárico presentó significativamente menor capacidad antioxidante en etanol (valores dos veces menores) que los ácidos ferúlico y sinápico. En general, los valores TEAC determinados en PBS fueron significativamente mayores que en etanol y también ligeramente mayores que los obtenidos en tampón citrato.

Tabla 4.3. Actividades antioxidantes de los compuestos fenólicos relacionados con la lignina y del HBT (12,5 μ M), determinadas como la capacidad de secuestrar radicales ABTS $^{\bullet+}$ después de 6 min (referida a la de Trolox).

	Etanol	PBS (pH 7,4)	Citrato (pH 5,0)
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,47	2,02	1,93
Ácido ferúlico	1,08	2,20	1,88
Ácido sinápico	1,15	2,23	2,08
Acetosiringona	0,44	1,21	0,23
Siringaldehído	0,36	1,21	0,58
Vainillina	0,33	0,98	0,21
Acetovainillona	0,33	1,38	0,42
HBT	0,33	0,06	0,00
Trolox	1,00	1,00	1,00

4.1.1.4. Capacidad mediadora de los ácidos *p*-hidroxicinámicos en reacciones con lacasa-ABTS

En esta ocasión, el radical ABTS $^{\bullet+}$ fue generado enzimáticamente mediante su oxidación por lacasa (espectro gris, Figura 4.3). La reacción se mantuvo durante 5 min para asegurar su completa oxidación (aunque ésta se alcanzó en los primeros 180 seg). A continuación, se añadió ácido sinápico, ferúlico o *p*-cumárico a la mezcla de reacción y se monitorizaron los cambios en el espectro UV-visible durante otros 5 min (recogiendo espectros cada 10 seg).

En todos los casos, se observó la reducción del radical ABTS $^{\bullet+}$ por los ácidos *p*-hidroxicinámicos (espectro rojo, Figura 4.3), siendo el ácido sinápico el más rápido en reducirlo, seguido del ácido ferúlico y del ácido *p*-cumárico, de acuerdo a sus respectivas capacidades antioxidantes mostradas en el apartado anterior.

Así, el ácido sinápico (Figura 4.3 A) fue capaz de reducir de forma instantánea los radicales ABTS $^{\bullet+}$ de manera que el espectro inicial recogido en el momento de añadir el ácido sinápico corresponde al ABTS completamente reducido (línea roja). Inmediatamente después comenzó la rápida re-oxidación de ABTS como se observa en los siguientes espectros por el incremento de absorbancia a 420 nm y el descenso a 335 nm,

simultáneamente con el incremento a 540 nm correspondiente a la oxidación del ácido sinápico por la lacasa (inserto). La oxidación completa del ABTS se obtuvo a los 240 seg (espectro azul, Figura 4.3 A).

En presencia de ácido ferúlico (Figura 4.3 B), el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ fue también rápidamente reducido (línea roja), comenzando a continuación la re-oxidación del ABTS, al mismo tiempo que se producía la oxidación de ácido ferúlico por la lacasa (descenso de absorbancia a 280-350 nm). Sin embargo, esta re-oxidación de ABTS fue más lenta que en presencia de ácido sinápico. De hecho, después de 240 seg la oxidación de ABTS por lacasa y ácido ferúlico no había finalizado (espectro azul, Figura 4.3 B) (el espectro se estabilizó después de 500 seg de reacción).

Finalmente, la reducción del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por el ácido *p*-cumárico fue notablemente inferior y más lenta que la obtenida con el ácido sinápico o ferúlico (Figura 4.3 C), ya que el primer espectro tras la adición de ácido *p*-cumárico (línea roja) corresponde al todavía parcialmente oxidado ABTS que fue reducido durante los siguientes seg. El ácido *p*-cumárico comenzó a ser lentamente oxidado por la lacasa (detectado por el descenso de absorbancia en el rango 250 a 320 nm) y, a pesar de ello, no se observó re-oxidación del ABTS durante los primeros 240 seg (espectro azul, Figura 4.3 C). Fueron necesarios 650 seg de reacción para obtener la máxima re-oxidación del ABTS.

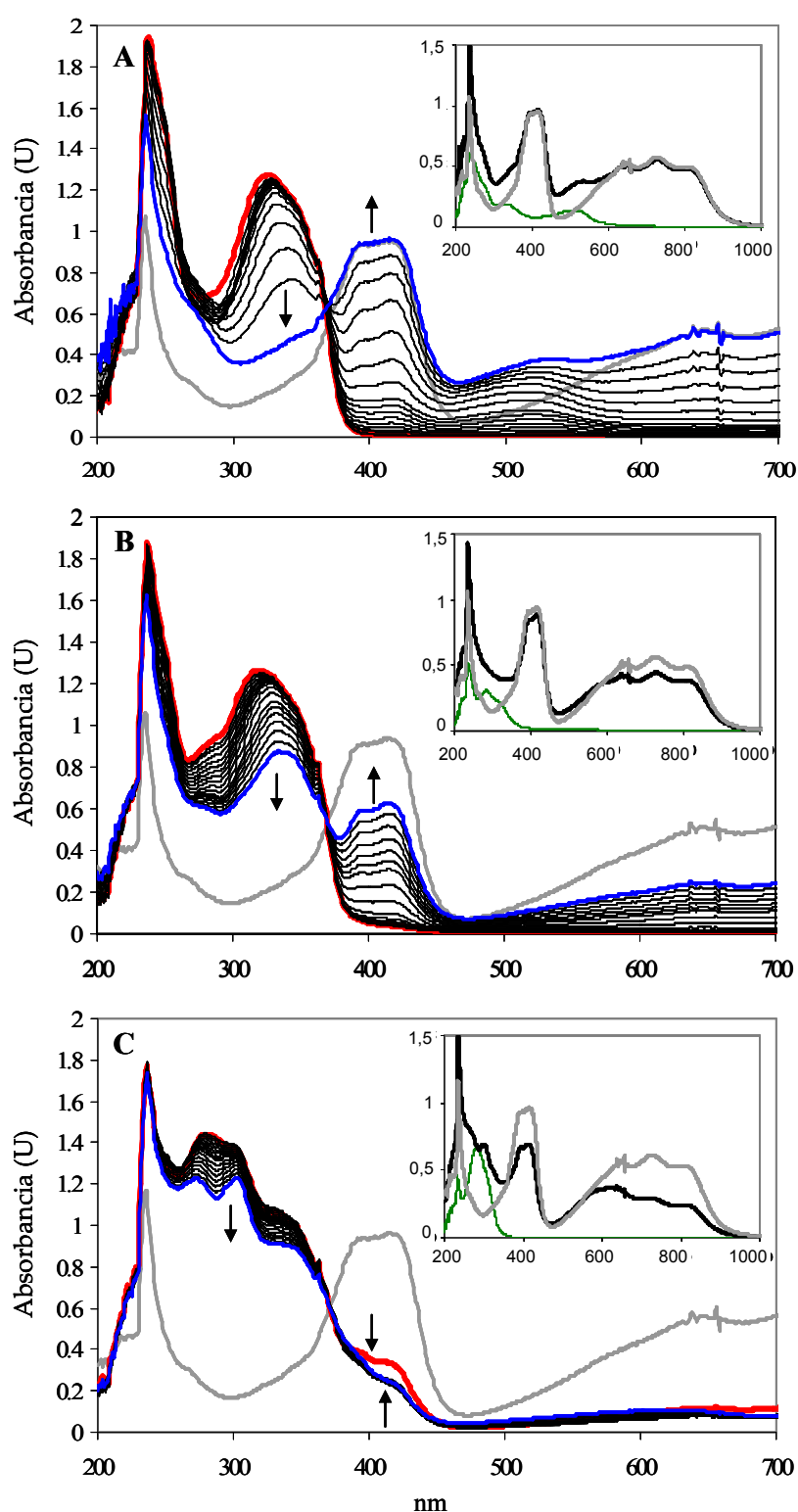
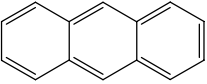
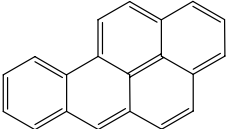
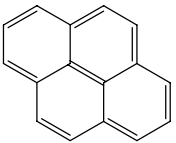
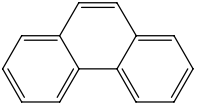


Figura 4.3. Espectros de oxidación/reducción de ABTS (50 μ M) por lacasa en presencia de ácido sinápico (A), ácido ferúlico (B) y ácido *p*-cumárico (C) (50 μ M). Insertos: espectros de oxidación máxima de ABTS obtenida con lacasa-SI, lacasa-FER y lacasa-PCU (línea negra), espectro de los mediadores oxidados por lacasa (espectro verde) y espectro del ABTS oxidado por lacasa en ausencia de mediador (línea gris).

4.1.2. TRANSFORMACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR LACASA Y MEDIADORES NATURALES

Se ensayó la capacidad de diversos compuestos fenólicos relacionados con la lignina como acetosiringona, siringaldehído, vainillina, acetovainillona, y los ácido *p*-hidroxicinámicos *p*-cumárico, ferúlico y sinápico, para promover la transformación de PAHs por lacasa, comparándose con la del mediador artificial HBT.

Tabla 4.4. Características de los PAHs empleados en este trabajo.

PAH	Estructura	Peso molecular	Solubilidad en agua (mg/L)	Potencial redox
Antraceno		178,23	0,045	1,09 V
Benzo[a]pireno		252,31	0,0038	1,27 V
Pireno		202,26	0,132	1,50 V
Fenantreno		178,23	4,57	1,50 V

4.1.2.1. Screening de mediadores naturales

En primer lugar se evaluaron las capacidades de acetosiringona, siringaldehído, vainillina, acetovainillona y ácido *p*-cumárico para promover la oxidación de antraceno por la lacasa de *P. cinnabarinus* y se compararon con la del mediador artificial HBT. La 9,10-antraquinona producida en la reacción fue determinada **colorimétricamente** una vez reducida con NaBH₄ a 9,10-hidroantraquinona (de color naranja).

De todos los compuestos de origen natural ensayados como mediadores, el ácido *p*-cumárico produjo la mayor transformación de antraceno a 9,10-antraquinona, similar a la obtenida con el mediador HBT (Figura 4.4).

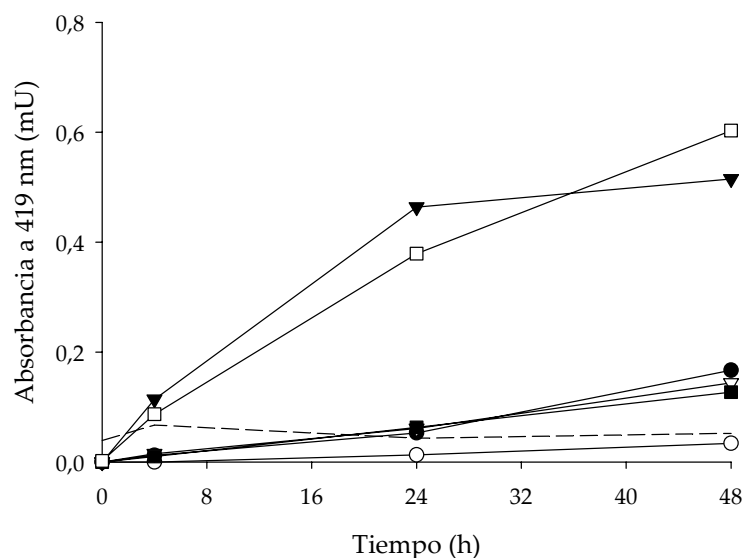


Figura 4.4. Producción de 9,10-hidroantraquinona (detectada a 419 nm) a partir de la oxidación de antraceno (250 µM) con lacasa de *P. cinnabarinus* (2 U/mL) sola (---) y en presencia de los siguientes mediadores naturales (500 µM): acetosiringona (●), siringaldehído (○), ácido *p*-cumárico (▼), vainillina (▽), acetovainillona (■) y el mediador artificial HBT (□).

Para confirmar los resultados preliminares obtenidos con el ensayo colorimétrico, se llevó a cabo un *screening* de mediadores naturales de lacasa mediante **análisis cromatográfico por HPLC**. Además de los compuestos anteriormente mencionados, se ensayaron otros dos ácidos *p*-hidroxicinámicos, ferúlico y sinápico, para comparar con el ácido *p*-cumárico, con el que se habían obtenido los mejores resultados en el ensayo colorimétrico. Además, en la comparación se incluyeron también dos mediadores artificiales, HBT y ABTS.

Se cuantificó la degradación de antraceno y la producción de 9,10-antraquinona, que fue el principal producto de oxidación obtenido con todos los sistemas lacasa-mediador ensayados. En concordancia con los datos mostrados anteriormente, el ácido *p*-cumárico resultó ser el mejor mediador de lacasa de todos los compuestos de origen natural ensayados (seguido por vainillina y acetovainillona). Produjo una mayor y más rápida oxidación de antraceno que el ABTS y muy similar a la obtenida con HBT (un 95 % en 24 h utilizando lacasa y ácido *p*-cumárico frente al 99,5 %

utilizando lacasa y HBT) (Figura 4.5). De forma paralela, un 36 % y un 52 % de 9,10-antraquinona fue producida por ambos sistemas respectivamente.

Por otro lado, ni el ácido ferúlico ni el sinápico actuaron como buenos mediadores de lacasa.

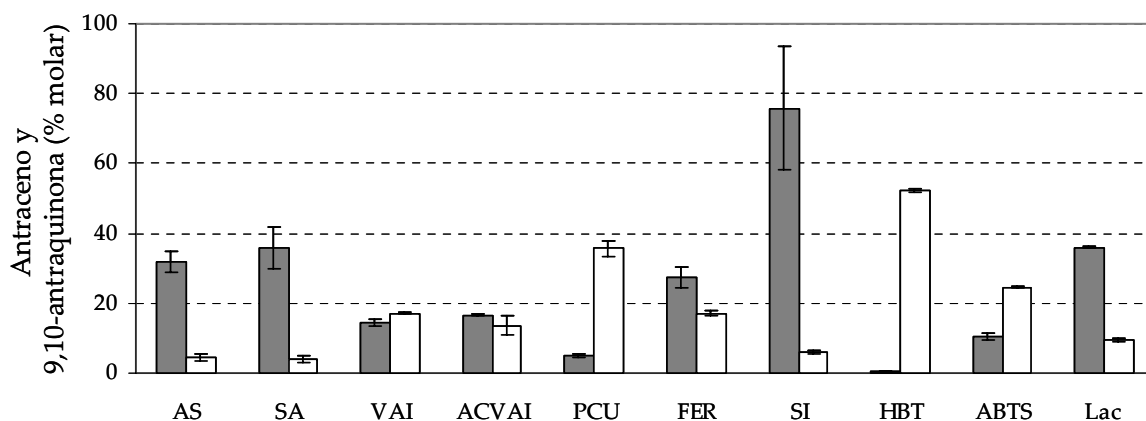


Figura 4.5. Porcentajes molares de antraceno residual (■) y de 9,10-antraquinona producida (□) después de 24 h de oxidación de antraceno (50 µM) con lacasa de *P. cinnabarinus* y diferentes mediadores (500 µM); acetosiringona (AS), sirinaldehído (SA), vainillina (VAI), acetovainillona (ACVAI), ácido *p*-cumárico (PCU), ácido ferúlico (FER), ácido sinápico (SI), HBT y ABTS; Lac, lacasa sin mediador. Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

4.1.2.2. Oxidación de antraceno con lacasa y ácido *p*-cumárico

Una vez seleccionado el ácido *p*-cumárico (PCU) como mediador natural de lacasa, de acuerdo con los resultados del apartado anterior, se determinó la influencia de la concentración de dicho mediador en los niveles de oxidación de antraceno y producción de 9,10-antraquinona. La lacasa de *P. cinnabarinus* fue capaz de transformar el 60 % del antraceno inicial en 24 h sin mediador, sin embargo, solamente se obtuvo un 9 % de 9,10-antraquinona con respecto a la concentración molar inicial de antraceno. La presencia de ácido *p*-cumárico promovió significativamente la degradación de antraceno (más del 90 % en 48 h), no siendo necesarias concentraciones de éste superiores a 100 µM (Figura 4.6 A). Por el contrario, existió una correlación directa entre la concentración de este mediador y la cantidad de 9,10-antraquinona producida (Figura 4.6 B). Más del 50 % del antraceno inicial fue transformado a 9,10-antraquinona después de 48 h en presencia de la mayor concentración de ácido *p*-cumárico. En presencia de altas concentraciones de mediador, la cantidad de quinona descendió tras más de 48 h de incubación (no se muestran los datos), de igual manera que ocurrió

en presencia de HBT. Sin embargo, no se pudieron detectar otros productos de oxidación (u oligomerización), ni siquiera llevando a cabo una extracción líquida de las mezclas de reacción con acetato de etilo.

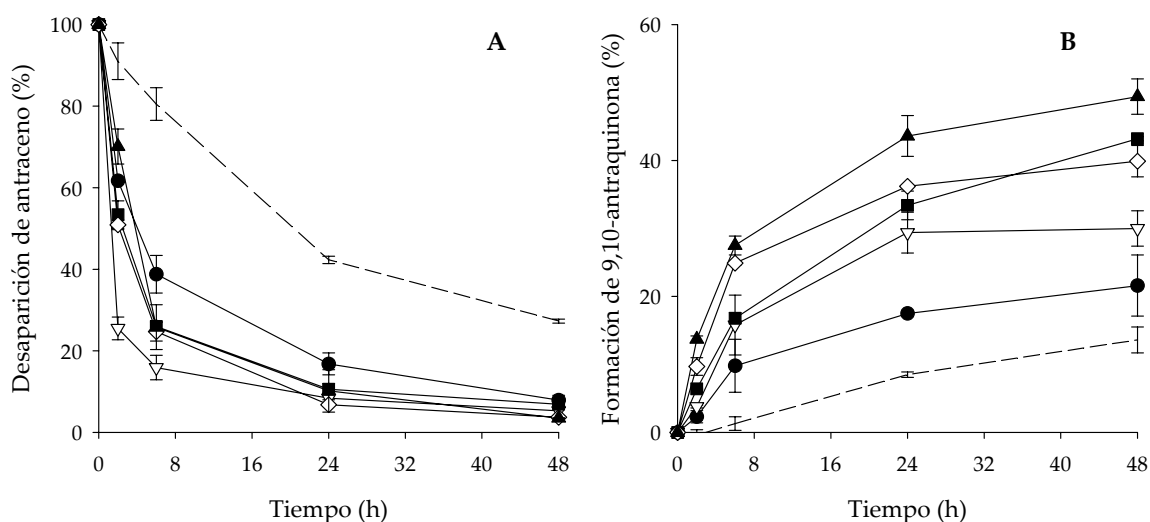


Figura 4.6. Efecto de la concentración de ácido *p*-cumárico en la degradación de antraceno (50 μ M) (A) y producción de 9,10-antraquinona (B) por la lacasa de *P. cinnabarinus*. Relaciones ácido *p*-cumárico/antraceno de: 1 (●), 2 (▽), 4 (■), 10 (◇) y 20 (▲) y lacasa sin mediador (---). Se muestran los valores medios de 3 experimentos y sus límites de confianza del 95 %.

Por otro lado, se comparó la degradación de antraceno por el sistema lacasa-PCU con la producida por lacasa en presencia de los mediadores artificiales HBT y ABTS, pudiéndose observar diferencias en los productos de oxidación. Durante la transformación de antraceno por el sistema lacasa-ABTS, se detectó además de 9,10-antraquinona, un producto de degradación que no apareció tras la oxidación con lacasa-PCU o lacasa-HBT (Figura 4.7). Durante las primeras 48 h de reacción con lacasa-ABTS, la cantidad de 9,10-antraquinona aumentó hasta un 30 % con respecto a la concentración molar inicial de antraceno, mientras que la cantidad de este segundo metabolito comenzó a descender después de 24 h (Figura 4.8), sugiriendo su posterior transformación por el sistema lacasa-ABTS.

Los espectros UV-visible de antraceno y del producto desconocido fueron muy similares. El análisis por HPLC/TOF-MS permitió detectar un compuesto con un ión mayoritario con m/z 195 ($M+1=194+1$) que se correspondería con la masa de la antrona o 9-hidroxiantraceno. Intentos de identificación adicionales por espectrometría de masas con impacto

electrónico no arrojaron resultados concluyentes, debido a la complejidad de los espectros obtenidos, que mostraban la existencia de diversas especies.

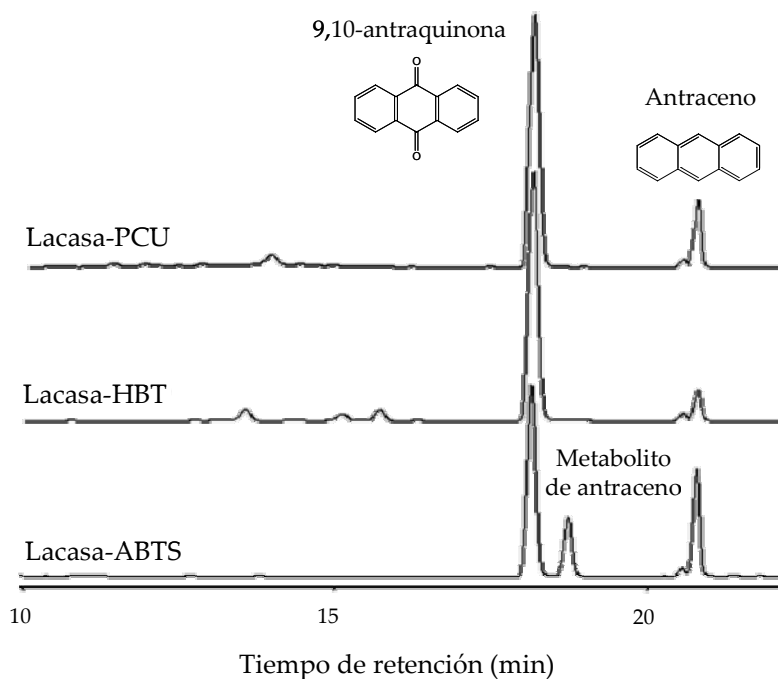


Figura 4.7. Perfiles cromatográficos tras 24 h de degradación de antraceno (50 µM) con lacasa en presencia de ABTS, HBT o ácido *p*-cumárico (PCU) como mediadores (500 µM).

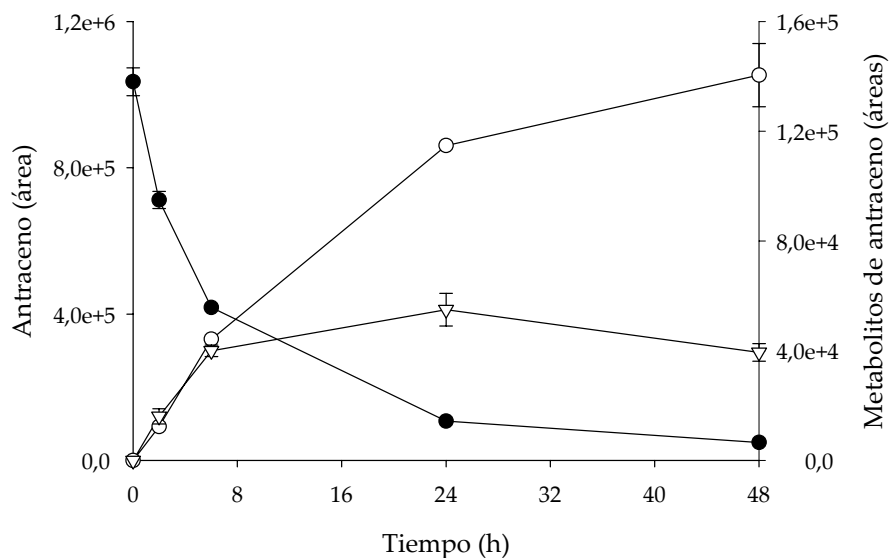


Figura 4.8. Desaparición de antraceno (50 µM) (●) y formación de 9,10-antraquinona (○) y del producto desconocido (▽) durante la oxidación del PAH con lacasa-ABTS (500 µM). Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

4.1.2.3. Oxidación de benzo[a]pireno por lacasa y mediadores naturales

Análogamente al ensayo con antraceno, se evaluó la capacidad de acetosiringona, siringaldehído, vainillina, acetovainillona, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácido sinápico para promover la transformación de benzo[a]pireno por la lacasa de *P. cinnabarinus*. Se compararon los resultados del análisis cromatográfico con los obtenidos utilizando la enzima sola o en presencia de los mediadores artificiales HBT y ABTS.

La lacasa en ausencia de mediador fue capaz de degradar únicamente un 12 % del benzo[a]pireno tras 24 h de reacción.

La presencia de los compuestos naturales vainillina, acetovainillona, y sobre todo de ácido *p*-cumárico, incrementaron notablemente la transformación de benzo[a]pireno por la enzima (Figura 4.9). Con éste último mediador, de la misma manera que ocurrió para el antraceno, se obtuvieron porcentajes de degradación significativamente mayores que los obtenidos en presencia del resto de los compuestos naturales, similares a los obtenidos con lacasa-HBT, y mejores que los alcanzados con lacasa-ABTS.

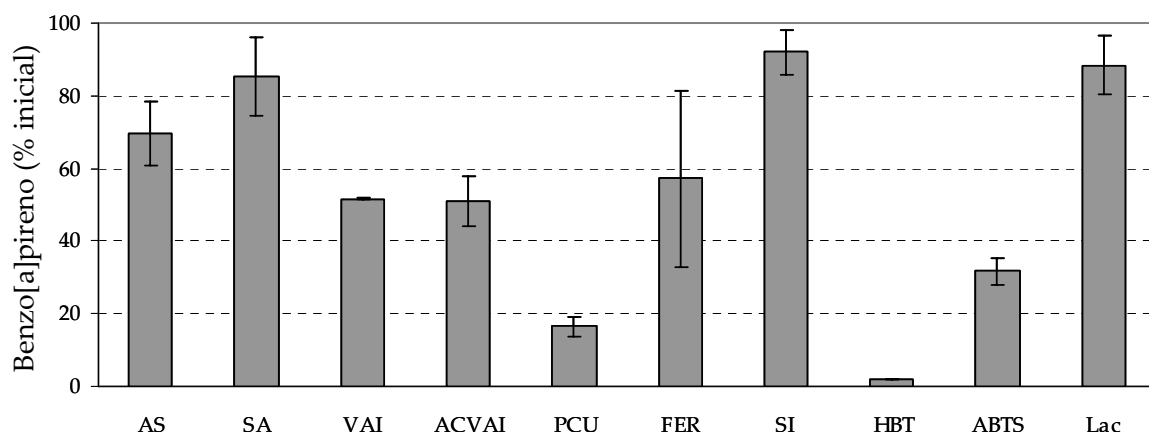


Figura 4.9. Benzo[a]pireno residual (% con respecto a la concentración inicial 50 μ M) después de 24 h de oxidación con lacasa de *P. cinnabarinus* y diferentes mediadores (500 μ M): acetosiringona (AS), siringaldehído (SA), vainillina (VAI), acetovainillona (ACVAI), ácido *p*-cumárico (PCU), ácido ferúlico (FER), ácido sinápico (SI), HBT y ABTS; Lac, lacasa sin mediador. Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

4.1.2.4. Análisis de los productos de oxidación de benzo[a]pireno

Se llevó a cabo un análisis pormenorizado de los productos de degradación de benzo[a]pireno generados tras su oxidación con lacasa y el

mediador natural seleccionado, PCU, y se compararon con los obtenidos con lacasa-HBT y lacasa-ABTS (Figura 4.10).

El análisis directo por HPLC de las mezclas de reacción no permitió detectar ningún producto de oxidación, aunque sí se detectó la acumulación de un producto mayoritario durante la transformación de benzo[a]pireno por el sistema lacasa-ABTS, que no fue observado con ninguno de los otros dos sistemas lacasa-mediador (Figura 4.11).

La extracción de las muestras con acetato de etilo y su concentración previa al análisis por HPLC-PAD, permitió la detección e identificación de productos minoritarios generados durante la oxidación de benzo[a]pireno con los tres sistemas lacasa-mediador ensayados. Entre dichos productos, tres de ellos mostraron el espectro característico de las benzo[a]pireno 1,6-, 3,6-, y 6,12- quinonas (Figura 4.10) (Longfellow *et al.*, 1993).

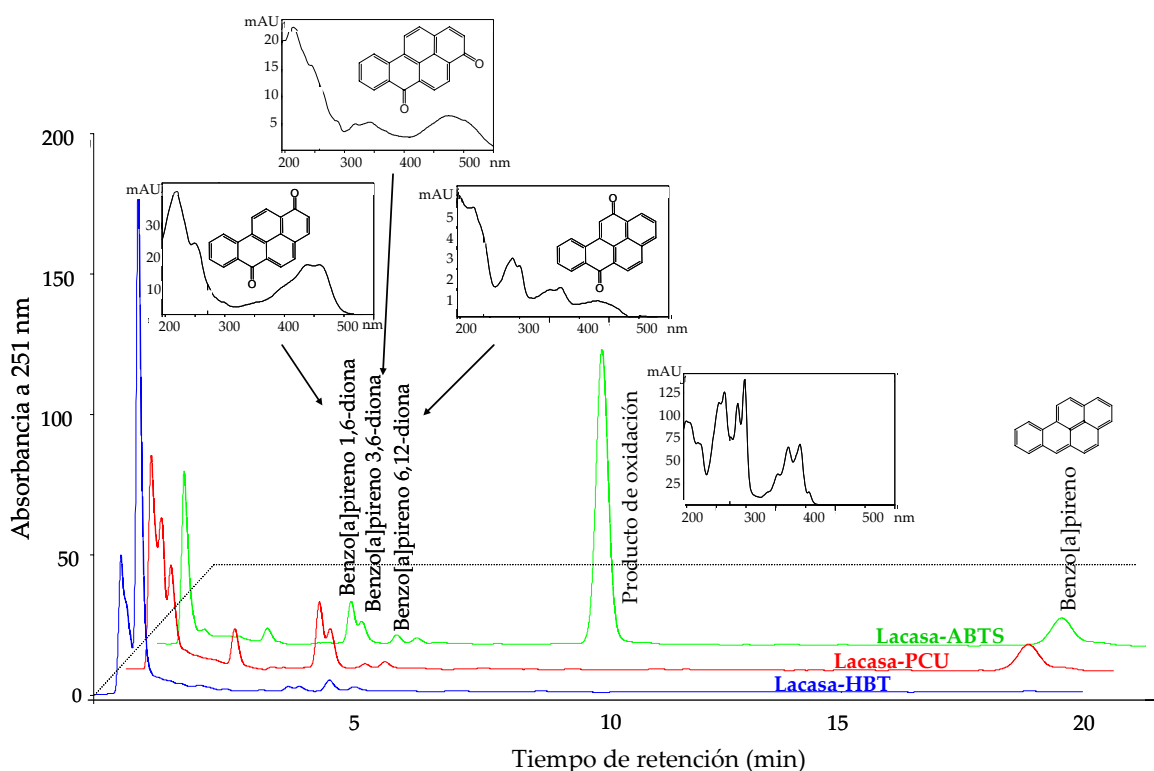


Figura 4.10. Comparación de los perfiles cromatográficos (HPLC-PAD) tras 48 h de degradación de benzo[a]pireno (50 μ M) con lacasa en presencia de ABTS, HBT o ácido *p*-cumárico (PCU) como mediadores (500 μ M). En los insertos se muestran los espectros UV-visible de las tres quinonas derivadas del benzo[a]pireno, producidas por los tres sistemas enzimáticos, y el principal producto de oxidación de la reacción con lacasa-ABTS.

En la fracción soluble de la mezcla de reacción no se detectaron nuevos productos de oxidación, y la acidificación de la muestra previa a su extracción con acetato de etilo y análisis por HPLC tampoco supuso la detección de otros productos de oxidación.

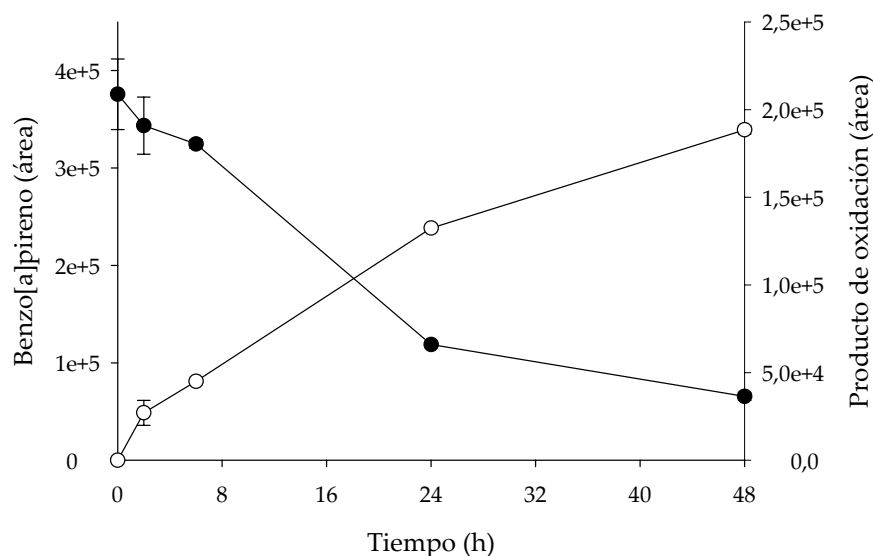


Figura 4.11. Desaparición de benzo[a]pireno (50 μ M) (●) y formación del producto desconocido detectado por HPLC (○) durante la oxidación por lacasa-ABTS (500 μ M). Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

El espectro UV-visible del principal pico detectado durante el análisis por HPLC-PAD del benzo[a]pireno oxidado por lacasa-ABTS fue muy similar al del benzo[a]pireno. El análisis por HPLC/TOF-MS del extracto de acetato de etilo de la mezcla de reacción reveló un ión con m/z 311 ($M+1$) en este pico (aunque no se descartó la presencia de otras especies químicas). El espectro de masas obtenido por impacto electrónico de la fracción más volátil del mismo pico (Figura 4.12 A) confirmó la presencia de un producto de masa molecular 310. La formación de un derivado acetilado de benzo[a]pireno (6-benzo[a]pirenil acetato) se puso de manifiesto por la existencia del ión con m/z 310 y el pico base con m/z 268 generado por la pérdida del grupo acetilo unido al 6-hidroxibenzo[a]pireno. Además, se encontraron iones con m/z 119 y 239, característicos del espectro de masas de diferentes isómeros de hidroxibenzo[a]pireno.

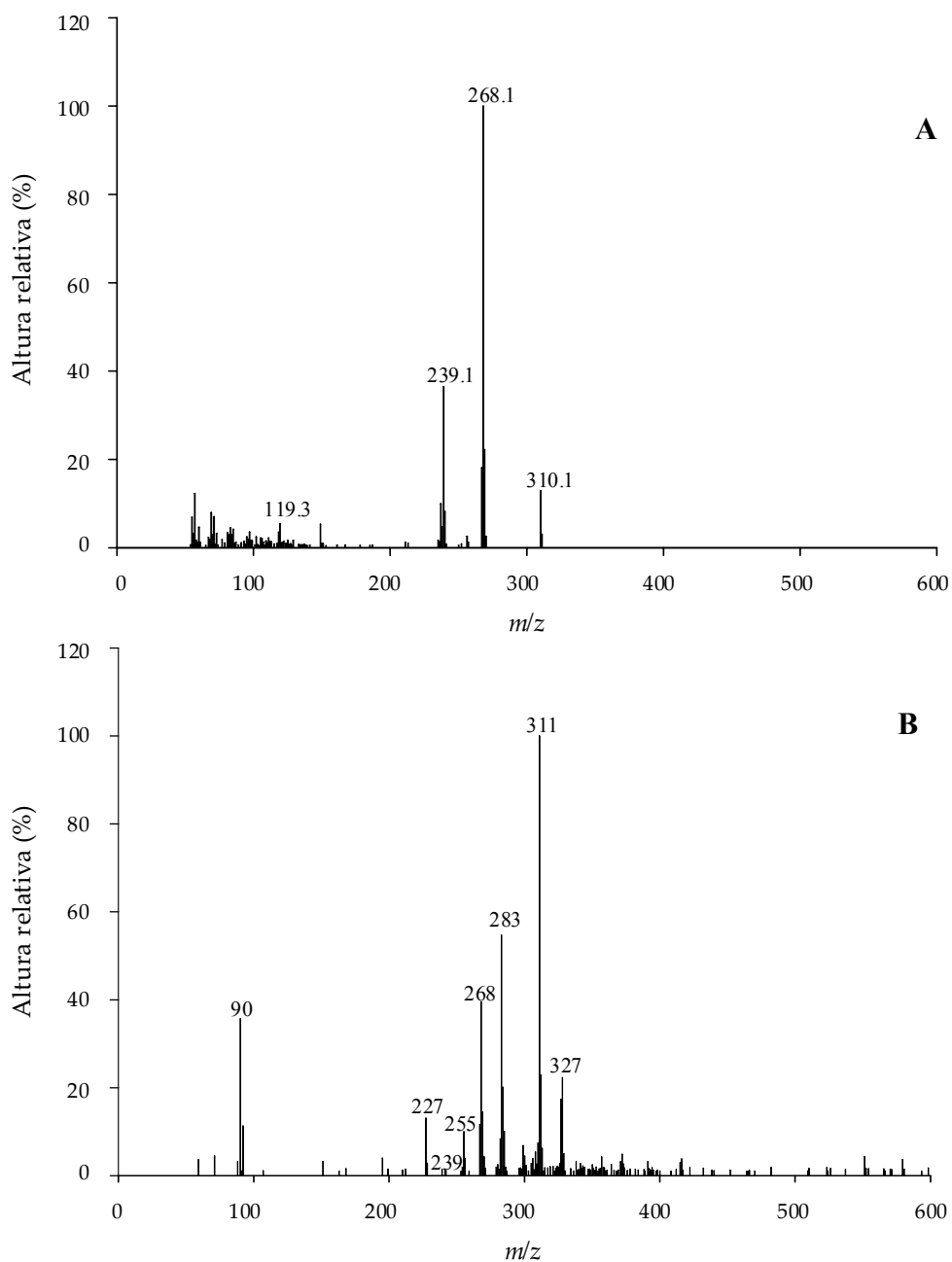


Figura 4.12. Espectro de masas del principal producto obtenido en la degradación de benzo[a]pireno (50 μM) con lacasa y ABTS (500 μM) tras la extracción de la mezcla de reacción con acetato de etilo: **(A)** MS-impacto electrónico de la fracción más volátil del pico desconocido y **(B)** MS-APCI-FIA del mismo pico (energía de fragmentación 30 V).

La identificación de 6-benzo[a]pirenil acetato como principal producto de la oxidación de benzo[a]pireno por lacasa-ABTS se confirmó mediante análisis con interfase APCI (FIA), encontrando como principal ión m/z 311 (Figura 4.12 B), que fue más o menos fragmentado dependiendo de las

energías de fragmentación aplicadas. Además, junto con los iones con m/z característicos de este producto, se detectaron otros iones que podrían corresponder a un derivado de oxidación posterior como hidroxí-6-benzo[a]pirenil acetato, con un ión molecular de m/z 327 (M+1) y picos de fragmentación de m/z 283 y 255.

Para confirmar la identificación de este producto, se llevó a cabo la degradación de benzo[a]pireno con lacasa-ABTS en tampón citrato sódico 100 mM, pH 5,0 (en lugar de acetato sódico), y se comprobó la formación de las tres quinonas de benzo[a]pireno y la ausencia del metabolito mayoritario (benzo[a]pirenil acetato).

4.1.2.5. Oxidación de diferentes PAHs por lacasa y ácido *p*-cumárico

Se comparó la oxidación de antraceno, benzo[a]pireno y pireno por lacasa y ácido *p*-cumárico, utilizando dos concentraciones de mediador, una baja (relación mediador/PAH de 2) y otra alta (relación mediador/PAH de 20) (Figura 4.13).

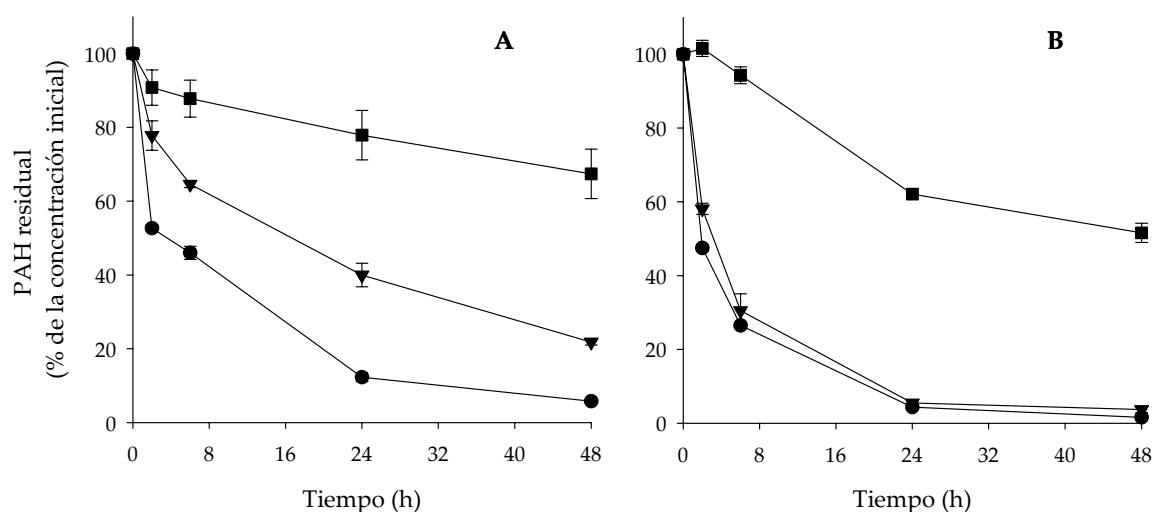


Figura 4.13. Degradación de antraceno (●), benzo[a]pireno (▼) y pireno (■) (50 μM) por lacasa y ácido *p*-cumárico, utilizando dos concentraciones de mediador: 100 μM (A) y 1 mM (B). Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

El pireno fue muy escasamente degradado por la lacasa de *P. cinnabarinus* en ausencia de mediador (sólo un 8 % tras 24 h de reacción). La presencia de ácido *p*-cumárico incrementó significativamente la degradación de pireno igual que ocurrió con antraceno y benzo[a]pireno. Además, la concentración del mediador influyó positivamente en la velocidad de degradación de los

diferentes PAH. Es más, la concentración de ácido *p*-cumárico influyó más notablemente en los porcentajes de degradación finales de los PAHs más recalcitrantes. Mientras que en la degradación de antraceno por lacasa-PCU después de 24 h no se encontraron diferencias significativas, el benzo[a]pireno y pireno residual descendieron 35 y 20 % (con respecto a la concentración inicial de 50 μ M), respectivamente, cuando la concentración de ácido *p*-cumárico se incrementó de 100 μ M a 1 mM. A las 48 h de reacción con lacasa-PCU se consiguió la transformación completa de antraceno y benzo[a]pireno y el 50 % de transformación de pireno.

4.1.2.6. Reducción de la toxicidad de PAHs tras su oxidación por lacasa y ácido *p*-cumárico

El benzo[a]pireno es uno de los PAHs más tóxicos y recalcitrantes, considerado como la novena sustancia más peligrosa debido a su potencial mutagénico y carcinogénico en la salud humana (CDC *Priority List of Hazardous Substances*, 2007). Por este motivo se ha elegido como modelo de PAH para analizar su posible detoxificación, tras su oxidación por el sistema lacasa-PCU, en organismos pertenecientes a diferentes niveles de la escala trófica, entre los que se encuentran bacterias, algas y crustáceos.

Mediante la exposición de los organismos a concentraciones crecientes de benzo[a]pireno, se obtuvieron los valores de CE₅₀, que representan la concentración efectiva del mismo que causa la inhibición del 50 % de la luminiscencia en la bacteria *Photobacterium phosphoreum*, del crecimiento del alga *Scenedesmus subspicatus* o de la supervivencia del microcrustáceo *Daphnia magna*. El valor de CE₅₀ obtenido para las bacterias fue 1.200 nM, para las algas 28,5 nM, mientras que los microcrustáceos resultaron ser los organismos menos sensibles al PAH de estudio, con un valor de 1.370 nM.

Con el fin de evaluar la toxicidad del benzo[a]pireno tras ser oxidado por lacasa-PCU, se realizaron los test toxicológicos exponiendo a los organismos mencionados a diferentes concentraciones de la mezcla de reacción conteniendo benzo[a]pireno antes y después de su oxidación. La toxicidad del benzo[a]pireno oxidado por lacasa-PCU fue inferior a la toxicidad inicial del PAH en los tres sistemas biológicos ensayados. La toxicidad frente a algas y crustáceos se redujo a la mitad, aunque las algas presentaron una sensibilidad a la mezcla de reacción muy superior a la de cualquiera de los otros dos sistemas biológicos (Tabla 4.5). Se decidió comparar el descenso de toxicidad experimentado en *D. magna* tras la oxidación con lacasa-PCU

con el obtenido empleando el mediador artificial HBT. Se observó que la reducción de la toxicidad con HBT fue menor que con el mediador natural, obteniendo un 25 y un 40-50 % de reducción, respectivamente.

Tabla 4.5. Toxicidad de la mezcla de reacción de benzo[a]pireno antes y después de 72 h de degradación con lacasa y ácido *p*-cumárico (PCU) ó HBT en diferentes especies. Los valores muestran la concentración (CE_{50}), expresada como porcentaje de la mezcla de reacción en el medio de exposición (v/v).

	Microtox® Luminiscencia	<i>S. subspicatus</i> Crecimiento	<i>D. magna</i> Supervivencia
Benzo[a]pireno	13,4	1,14	54,8
Benzo[a]pireno + lac-PCU	14,9	2,5	> 90,0
Benzo[a]pireno + lac-HBT	--	---	72,4

4.1.2.7. Peroxidación de lípidos como vía extra de oxidación de PAHs recalcitrantes con lacasa y ácido *p*-cumárico

- Peroxidación de lípidos

Se ensayó la oxidación de ácido linoleico con lacasa en presencia de los ácidos *p*-hidroxicinámicos sinápico, ferúlico y *p*-cumárico. Se detectó la peroxidación del ácido linoleico por lacasa en presencia de 2 mM de ácido *p*-cumárico y, en menor medida de ácido sinápico. Sin embargo, ni la presencia de ácido ferúlico ni la de los otros dos ácidos en concentración 500 μ M promovió la formación de TBARS por la enzima (Figura 4.14 A).

Posteriormente, se comparó la producción de TBARS por el sistema lacasa-PCU con la producida por el sistema lacasa-HBT en la oxidación de ácido linoleico y Tween 80. Los niveles de TBARS obtenidos a partir de la oxidación de ácido linoleico fueron significativamente mayores con lacasa-PCU, aunque el HBT actuó más rápidamente promoviendo la rápida peroxidación del ácido (Figura 4.14 B). Los dos sistemas lacasa-mediador fueron capaces así mismo, de peroxidar el Tween 80, si bien los niveles de TBARS obtenidos fueron menores que los obtenidos a partir del ácido linoleico (de acuerdo con el menor grado de insaturación del Tween 80).

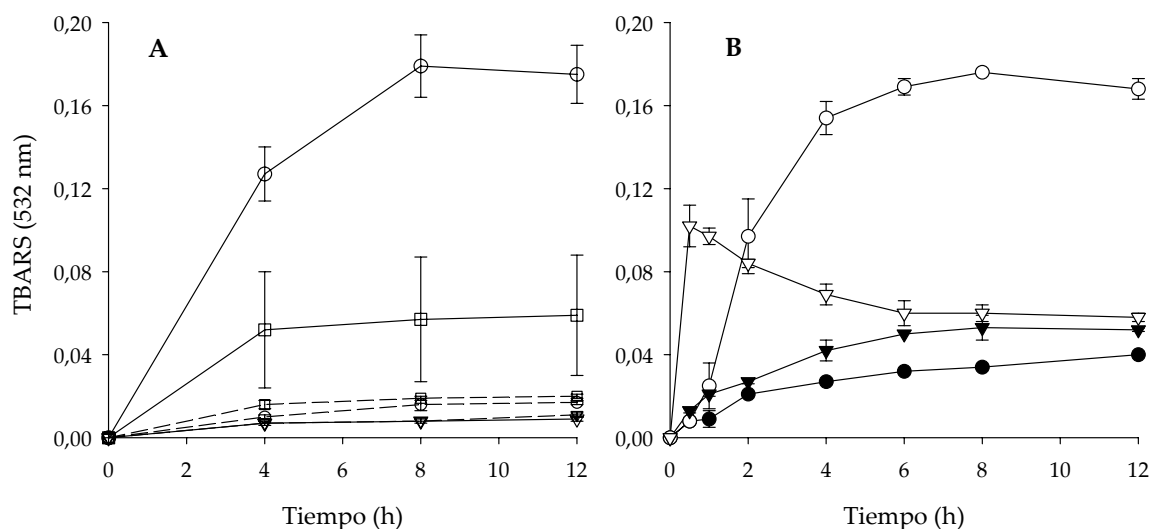


Figura 4.14. Peroxidación de lípidos. (A) Producción de TBARS por lacasa en presencia de 0,5 (---) y 2 mM (—) de ácido *p*-cumárico (○), ácido ferúlico (∇) y ácido sinápico (□), utilizando 0,7 mM de ácido linoleico como sustrato. (B) Comparación de la producción de TBARS a partir de la oxidación de ácido linoleico 0,7 mM (símbolos abiertos) o Tween 80 2 mM (símbolos cerrados) por lacasa y ácido *p*-cumárico (círculos) o HBT (triángulos) como mediadores (concentración 2 mM). Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

• Oxidación de Fenantreno

El fenantreno es un PAH muy recalcitrante a la degradación. De hecho, la lacasa de *P. cinnabarinus* fue incapaz de transformar el fenantreno, y únicamente se obtuvo un 10 % de oxidación tras 9 días de incubación en presencia de ácido *p*-cumárico o HBT como mediadores (Figura 4.15).

Dada la capacidad del sistema lacasa-PCU para peroxidar ácidos grasos insaturados, se estudió el posible efecto de dichos peróxidos para promover la oxidación de fenantreno a través del sistema lacasa-mediador natural. Para ello, se añadió Tween 80 a la mezcla de reacción como fuente de ácidos grasos insaturados, en lugar de Tween 20 (utilizado como surfactante). En presencia de Tween 80, se produjo un significativo aumento de la transformación de fenantreno por lacasa-PCU (y lacasa-HBT), especialmente tras largos periodos de reacción.

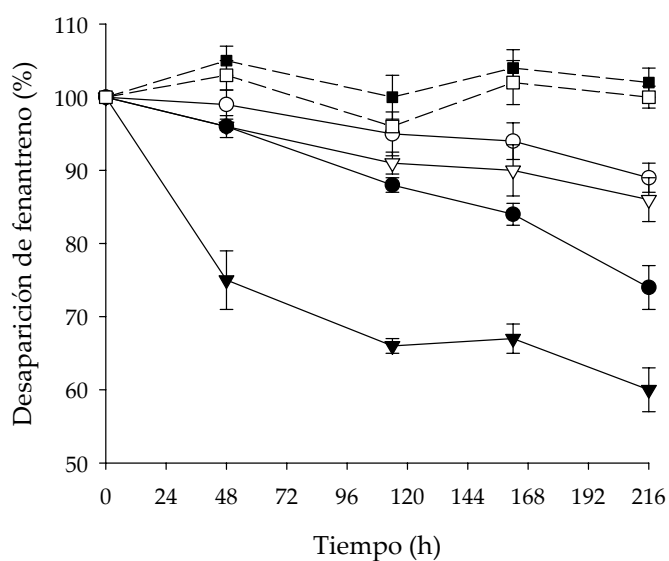
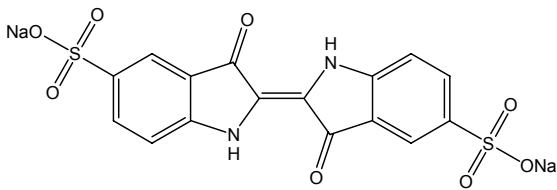
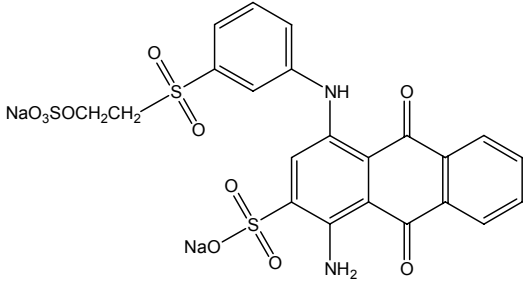
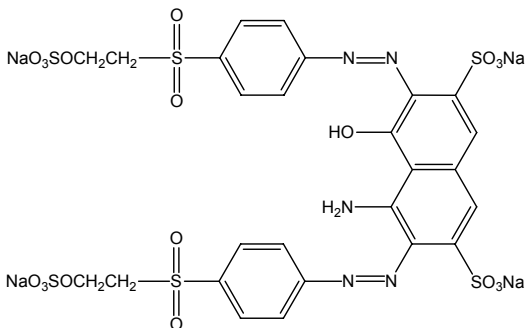
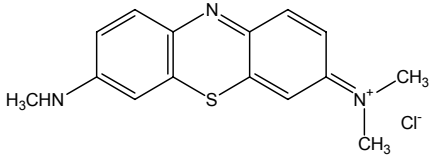


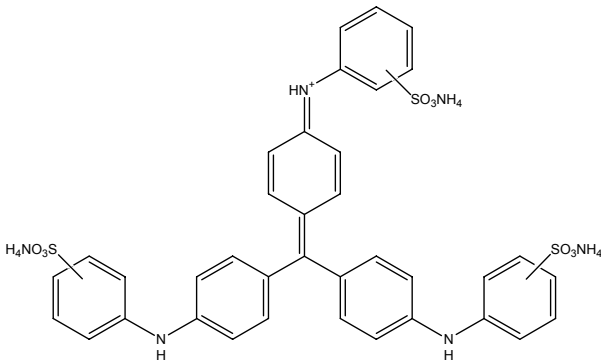
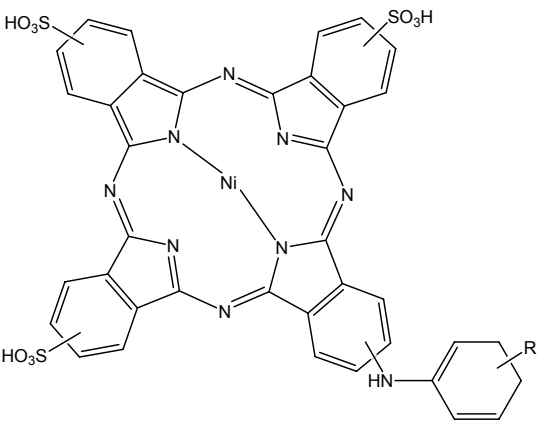
Figura 4.15. Degradación de fenantreno (%) por la lacasa de *P. cinnabarinus* (---) y ácido *p*-cumárico (círculos) ó HBT (triángulos), en presencia de 1 % de Tween 20 (símbolos abiertos) o Tween 80 (símbolos cerrados). Relación mediador/fenantreno de 10. Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

4.1.3. OXIDACIÓN DE COLORANTES POR LACASA Y ÁCIDOS *p*-HIDROXICINÁMICOS COMO MEDIADORES NATURALES

Se evaluó la capacidad de los ácidos *p*-hidroxicinámicos para promover la decoloración de diversos colorantes (Tabla 4.6) por la lacasa de *P. cinnabarinus*.

Tabla 4.6. Estructuras químicas de los colorantes ensayados.

Nombre	Estructura	Tipo de cromóforo	Máx. Abs (λ, nm)
<i>Acid Blue 74</i>		Indigo	608
<i>Reactive Blue 19</i>		Antraquinona	592
<i>Reactive Black 5</i>		Diazo	598
<i>Azure B</i>		Heterociclo	647

Nombre	Estructura	Tipo de cromóforo	Máx. Abs (λ nm)
<i>Aniline Blue</i>		Triarilmetano	592
<i>Reactive Blue 38</i>		Ftalocianina	620

4.1.3.1. Decoloración de diferentes tipos de colorantes

Los ácidos *p*-hidroxicinámicos fueron evaluados como mediadores de lacasa en la oxidación de diferentes tipos de colorantes industriales (Figura 4.16). Se determinó el efecto de la concentración de cada uno de estos compuestos en la decoloración de los tintes (Figura 4.17), ensayándose concentraciones de mediador entre 1 y 10 veces la concentración de colorante.

Acid Blue 74. Este colorante de tipo indigo (Tabla 4.6) fue oxidado por la lacasa de *P. cinnabarinus* hasta un 50 % en 1 h de tratamiento. La enzima posee alta afinidad por este colorante, como reveló el valor de K_m obtenido (2,8 μM), siendo el más bajo entre todos los sustratos y mediadores investigados. Si bien, la constante catalítica es baja (k_{cat} 0,05) y fueron necesarias 2 h para alcanzar la total decoloración por la enzima. La

presencia de los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos aceleró notablemente la decoloración (Figura 4.16). Se necesitaron únicamente 10 min para conseguir el máximo de decoloración con lacasa y ácido sinápico, 30 min en presencia de ácido *p*-cumárico; y más del 80 % fue decolorado con lacasa y ácido ferúlico en 1 h.

Con respecto a las diferentes concentraciones de ácidos *p*-hidroxicinámicos empleadas, en general no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de decoloración obtenidos. Únicamente el cambio de 25 a 50 μM de ácido *p*-cumárico supuso un aumento de más del doble de decoloración de *Acid Blue 74* (Figura 4.17). Por encima de esta concentración (equivalente a una relación mediador/colorante de 2) no mejoraron los porcentajes de decoloración obtenidos por ninguno de los tres sistemas lacasa-mediador natural.

Empleando el test de toxicidad Microtox[®], se comprobó un descenso del 15 % de la toxicidad de este colorante tras ser oxidado por el sistema lacasa-PCU durante 2 h.

Reactive Black 5. La lacasa de *P. cinnabarinus* en ausencia de mediador no es capaz de oxidar este colorante de tipo diazo. Sin embargo, en presencia de los ácidos *p*-hidroxicinámicos como mediadores sí se produjo su decoloración, aunque a diferentes niveles (Figura 4.16). El ácido sinápico (50 μM) promovió significativamente la oxidación de *Reactive Black 5* hasta alcanzar valores de cerca del 60 % de decoloración a las 2 h de tratamiento. Los valores de decoloración obtenidos con los ácidos *p*-cumárico y ferúlico fueron del 17 y 8 %, respectivamente (relación mediador/colorante de 2).

La decoloración de *Reactive Black 5* estuvo directamente relacionada con la concentración de ácido sinápico como mediador de lacasa, consiguiéndose el 95 % de decoloración con una concentración 250 μM de este compuesto (Figura 4.17). Incrementos en la concentración de ácido *p*-cumárico y ferúlico no supusieron, por el contrario, un aumento significativo del grado de oxidación del colorante en los tiempos ensayados.

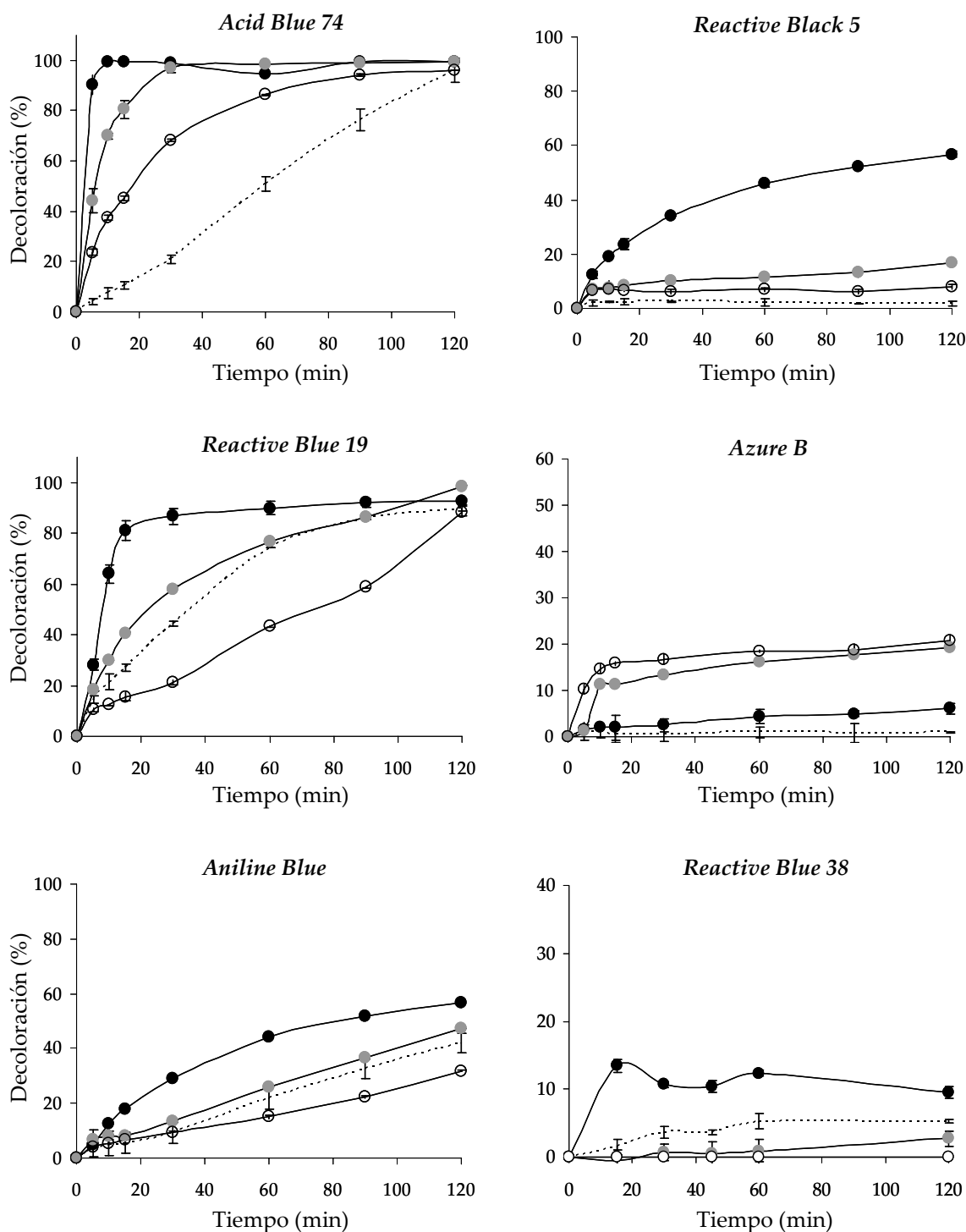


Figura 4.16. Decoloración de diferentes tipos de colorantes (25 μ M) por la lacasa de *P. cinnabarinus* sola (---) y en presencia de ácido *p*-cumárico (●), ácido sinápico (●) o ácido ferúlico (○) como mediadores (50 μ M). El descenso de absorbancia fue seguido a las longitudes de onda que se indican en la Tabla 4.6. Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

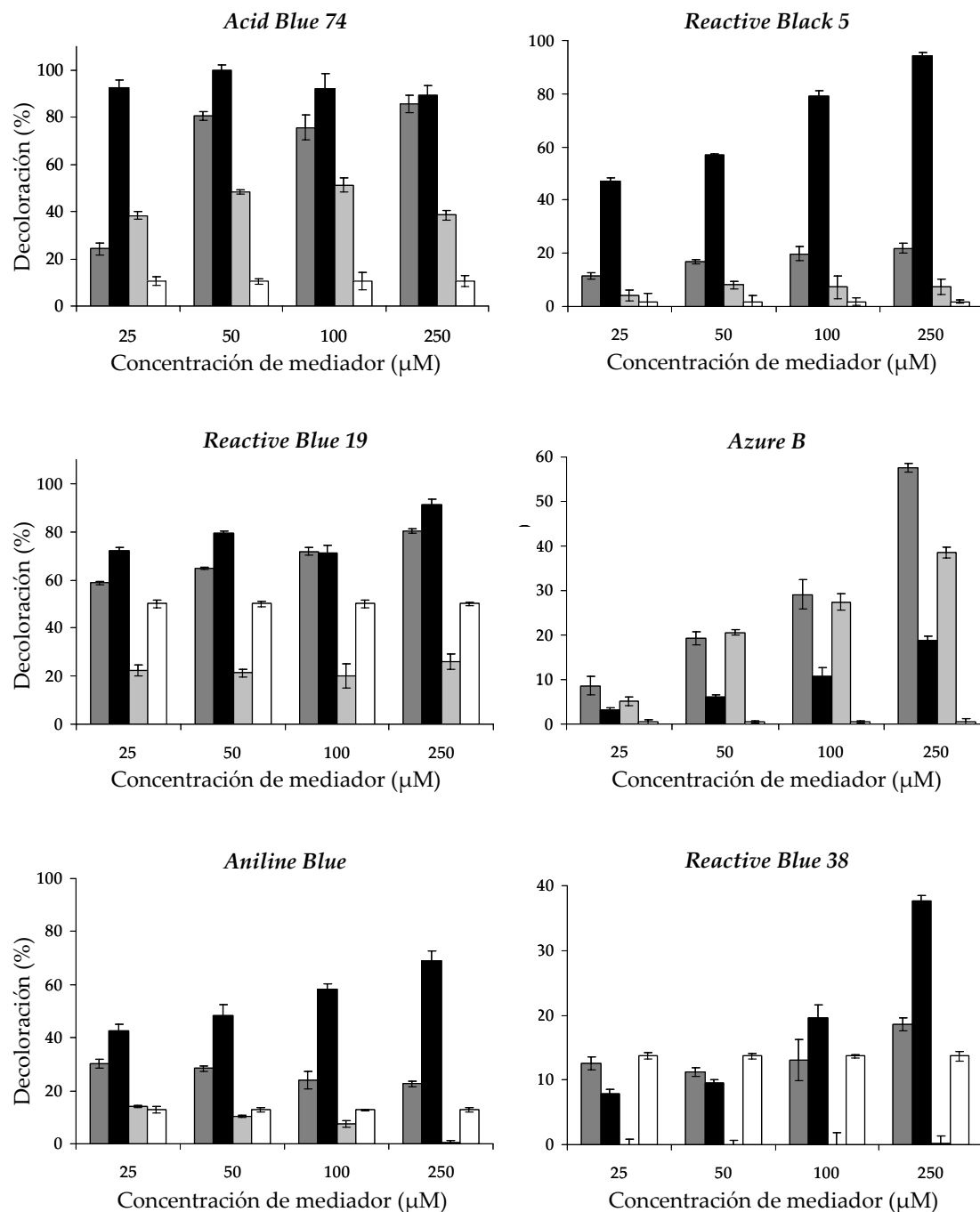


Figura 4.17. Efecto de la concentración de los mediadores ácido *p*-cumárico (■), ácido sinápico (■) y ácido ferúlico (■) en la decoloración de los colorantes (25 μM) que se indican por la lacasa de *P. cinnabarinus*. Lacasa en ausencia de mediador (□). La medida de absorbancia se tomó a las longitudes de onda indicadas en la Tabla 4.6 para cada colorante; y a los tiempos de 15 min para *Acid Blue 74*, 30 min para *Reactive Blue 19*, 2 h para *Aniline Blue*, *Reactive Black 5* y *Azure B* y 6 h para *Reactive Blue 38*. Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

En la Figura 4.18 se relaciona la velocidad de oxidación de los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos por la lacasa de *P. cinnabarinus* con su capacidad para actuar como mediadores en la decoloración de *Reactive Black 5*. A medida que se produce la decoloración del tinte se observa un descenso de absorbancia en toda la región del espectro visible (400-700 nm).

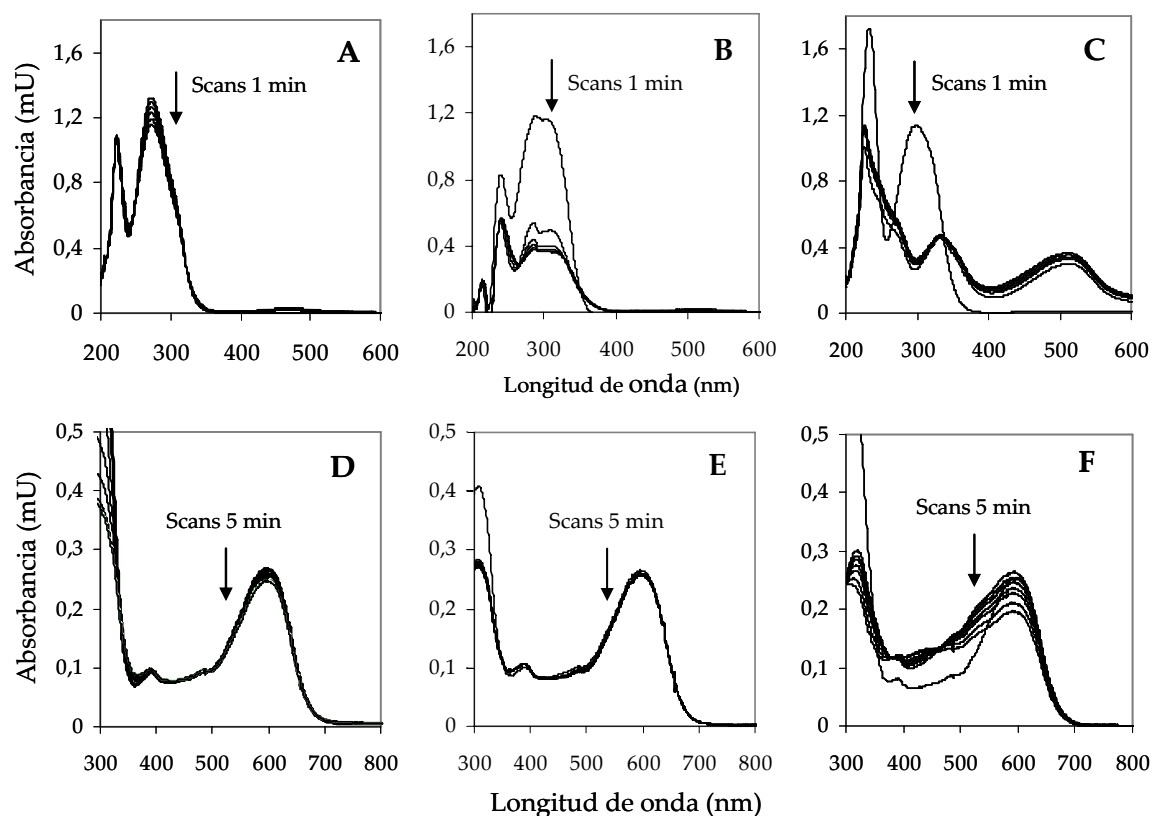


Figura 4.18. Cambios en los espectros de absorción del ácido *p*-cumárico (A), ácido ferúlico (B) y ácido sinápico (C) 100 μ M, durante 5 min de oxidación con 100 mU de lacasa de *P. cinnabarinus*. Decoloración del colorante *Reactive Black 5* (25 μ M) con lacasa en presencia de los citados mediadores en el orden anterior (D, E y F) en reacciones de 1 h.

El ácido sinápico es oxidado muy rápidamente por la lacasa y a su vez, se produce una significativa decoloración del *Reactive Black 5* en 1 h. Por el contrario, aunque el ácido ferúlico es más fácilmente oxidado por la lacasa, no fue capaz de promover la oxidación de *Reactive Black 5* siendo menor que la obtenida con el ácido *p*-cumárico, que fue oxidado mucho más lentamente. Este hecho pone de manifiesto que existen otros factores que determinar la capacidad mediadora de un compuesto.

Reactive Blue 19. Este colorante de tipo antraquinona (Tabla 4.6) fue decolorado por la lacasa de *P. cinnabarinus* hasta un 74 % del contenido

inicial, tras 1 h de incubación. De los tres mediadores ensayados (relación mediador/colorante de 2), fue nuevamente el ácido sinápico el que promovió de una forma más significativa la decoloración de este colorante por la lacasa, con valores superiores al 80 % tras 15 min de reacción. La presencia de ácido *p*-cumárico supuso mejoras en los niveles de decoloración a tiempos cortos (en los primeros 30 min) (Figura 4.16). Con ambos ácidos se observó en general una ligera tendencia positiva en la decoloración al incrementar la concentración de mediador en la reacción (Figura 4.17).

En contraposición con lo anterior, en presencia de ácido ferúlico se produjo una inhibición en la oxidación de *Reactive Blue 19* por la lacasa, obteniéndose solamente un 43 % de decoloración tras 1 h de incubación (Figura 4.16).

Azure B. La lacasa, en ausencia de mediador, no fue capaz de oxidar este colorante de tipo heterociclo (Tabla 4.6), igual que ocurrió con el *Reactive Black 5*. Sin embargo, en presencia de los ácidos *p*-hidroxicinámicos (relación mediador/colorante de 2), sí se produjo cierta decoloración (hasta un 20 % en 2 h con lacasa y ácido *p*-cumárico o lacasa y ácido ferúlico) (Figura 4.16). Estos porcentajes se incrementaron a medida que aumentó la concentración de ácido *p*-cumárico o ferúlico en la reacción, hasta obtener un 58 y 38 % respectivamente en presencia de la mayor concentración ensayada (Figura 4.17).

La oxidación del colorante por la enzima también se incrementó en presencia de ácido sinápico, aunque de forma menos acusada. Así los porcentajes de decoloración obtenidos con lacasa y ácido sinápico a las 2 h de reacción oscilaron entre el 2,5 % y el 19 % con la menor y la mayor concentración de mediador ensayadas, respectivamente.

Aniline Blue. Este colorante de tipo triarilmetano (Tabla 4.6) fue decolorado hasta un 42 % por la lacasa sola tras 2 h de reacción. La presencia de ácido sinápico, incrementó la velocidad de la reacción (Figura 4.16) y el nivel de decoloración final alcanzado (hasta el 57 % utilizando una concentración de mediador de 50 μ M y hasta el 70 % con 250 μ M) (Figura 4.17). Por el contrario, el ligero aumento de la decoloración obtenido en presencia de ácido *p*-cumárico 25 μ M, fue disminuyendo a medida que se incrementó la concentración del mediador (Figura 4.17). El ácido ferúlico inhibió la

oxidación de *Aniline Blue* por la lacasa, siendo esta inhibición mayor a medida que se incrementó la concentración de ácido (Figura 4.17).

Reactive Blue 38. Este colorante de tipo ftalocianina (Tabla 4.6) fue ligeramente oxidado por la lacasa de *P. cinnabarinus* (6 % tras 2 h de reacción) y únicamente el ácido sinápico promovió ligeramente su decoloración cuando se empleó una relación mediador/colorante equivalente a 2. Cuando se incrementó la concentración de ácido sinápico se alcanzó cerca del 40 % de decoloración. El ácido ferúlico produjo una clara inhibición de la oxidación de este colorante por la enzima, mientras que la presencia de ácido *p*-cumárico en la reacción sólo produjo un ligero efecto positivo con la mayor concentración empleada.

4.1.3.2. Estudios de inhibición de la decoloración con ácido ferúlico

El efecto negativo del ácido ferúlico en la decoloración de *Reactive Blue 19* por lacasa se investigó oxidando dicho ácido durante diferentes tiempos y añadiendo posteriormente el colorante a la mezcla de reacción.

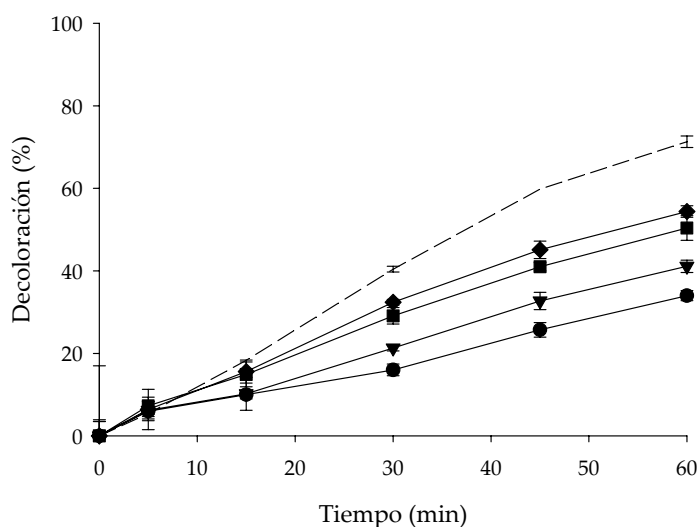


Figura 4.19. Decoloración de *Reactive Blue 19* (25 µM) por la lacasa de *P. cinnabarinus* en presencia de ácido ferúlico oxidado previamente durante 0 (●), 10 (▼), 30 (■) y 60 min (◆). Control con lacasa sola (---). Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

Los resultados obtenidos mostraron que a mayor tiempo de oxidación del ácido ferúlico por la enzima (0, 10, 30, y 60 min), se produjo menor inhibición en la decoloración de *Reactive Blue 19* (35 %, 42 %, 50 % y 57 % de decoloración, respectivamente, tras 1 h en contacto con el colorante) (Figura 4.19).

Como se indicó en el apartado anterior, el ácido ferúlico en concentraciones iguales o superiores a 25 μM también inhibió la decoloración del *Reactive Blue 38* por la lacasa de *P. cinnabarinus*. Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de ácido ferúlico en dicha inhibición, se ensayaron concentraciones de ácido ferúlico inferiores a la concentración de colorante empleada (3,125, 6,25, 12,5 y 25 μM).

Como se observa en la Figura 4.20, en concentraciones muy bajas, por debajo de 6,25 μM , el ácido ferúlico actuó como mediador de lacasa en la oxidación de *Reactive Blue 38*, sin embargo, cantidades superiores, causaron inhibición de la decoloración, sobre todo a tiempos de reacción superiores a 1 h.

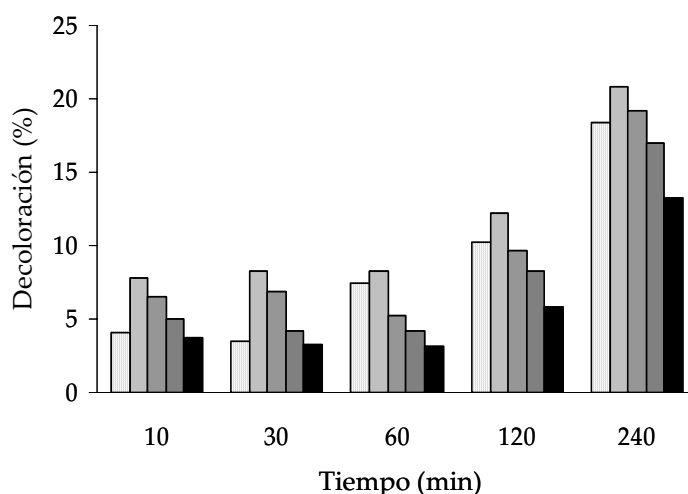


Figura 4.20. Decoloración de *Reactive Blue 38* (25 μM) por la lacasa de *P. cinnabarinus* en presencia de diferentes concentraciones de ácido ferúlico: 3,12 μM (□), 6,25 μM (▒), 12,5 μM (■) y 25 μM (■). Control con lacasa sola (□). Se muestran los valores medios de 3 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

4.1.3.3. Estudios de decoloración con siringaresinol como mediador

El siringaresinol es un dímero fenólico formado por la polimerización deshidrogenativa β - β' del alcohol sinapílico (Figura 4.21). Este compuesto fue evaluado como sustrato de lacasa, siendo fácilmente oxidado por la enzima, según indican sus constantes catalíticas (Tabla 4.7).

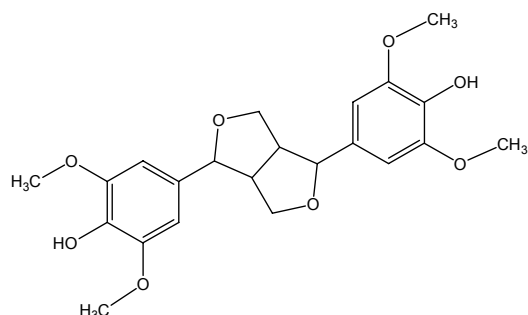


Figura 4.21. Estructura del dímero fenólico siringaresinol.

Tabla 4.7. Cinéticas de oxidación de siringaresinol por la lacasa de *P. cinnabarinus*.

	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Siringaresinol	5,8	7,4	1,27

Posteriormente, se investigó la capacidad del siringaresinol para actuar como mediador en reacciones de oxidación de colorantes catalizadas por lacasa. El incremento de la decoloración de todos los colorantes ensayados en presencia de este dímero fenólico, evidenció su capacidad para actuar como mediador redox de la enzima. Más aún, las mejoras en los valores de decoloración obtenidos con lacasa en presencia de siringaresinol fueron similares a las obtenidas con ácido sinápico (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Comparación de la decoloración (%) de diferentes colorantes tras 30 min de incubación con lacasa de *P. cinnabarinus* sola o en presencia de ácido sinápico o siringaresinol como mediadores (utilizando relaciones de mediador/colorante de 2 y 10).

	Lacasa	Ácido sinápico		Siringaresinol	
		2	10	2	10
<i>Acid Blue 74</i>	21,0	99,0	89,1	99,6	52,4
<i>Reactive Blue 19</i>	44,3	86,7	44,6	74,2	22,1
<i>Reactive Black 5</i>	2,5	34,1	68,2	31,9	17,5
<i>Aniline Blue</i>	9,2	29,1	34,4	47,2	16,0
<i>Azure B</i>	0,0	2,4	10,5	2,8	6,6

4.2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LACASAS DE ALTO POTENCIAL REDOX

Como paso previo a los experimentos de evolución molecular dirigida de la lacasa de *P. cinnabarinus* se optimizaron las condiciones de producción de lacasa activa en los cultivos de *S. cerevisiae* en placas de 96 pocillos. Después, se realizaron tres ciclos de evolución de esta lacasa en el laboratorio, y se purificó y caracterizó la variante evolucionada.

4.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN EN MICROCULTIVOS

La construcción α -PcL, formada por la secuencia del pre-propéptido del factor α de *S. cerevisiae* y la secuencia de la lacasa madura de *P. cinnabarinus* (ver apartado 3.2.6.6 de Materiales y Métodos), se transformó en células de *S. cerevisiae* en presencia del plásmido pJRoC30 previamente linearizado.

Éstas células se crecieron en placas de 96 pocillos, en medio mínimo durante 48 h. Posteriormente, se incubaron en medio de inducción en presencia de etanol y de dos compuestos fenólicos, ácido ferúlico y vainillina, con el fin de estudiar el efecto de éstos como inductores de la producción de lacasa en microcultivos de *S. cerevisiae*, con el fin de optimizar las condiciones que favoreciesen una mayor expresión de lacasa en los ensayos de evolución dirigida. Se determinó también el efecto de dichos compuestos en el crecimiento de la levadura.

Dado que el sistema de expresión de lacasa también es altamente dependiente de la cantidad de CuSO_4 en el medio de cultivo (Lee *et al.*, 1999; Palmieri *et al.*, 2000; Hoshida *et al.*, 2005), se determinó la concentración óptima en la que la producción de lacasa de *P. cinnabarinus* fuese máxima sin producir inhibición en el crecimiento de *S. cerevisiae*.

4.2.1.1. Efecto de las condiciones de inducción en el crecimiento

La presencia de etanol tuvo un efecto positivo sobre la producción de biomasa de *S. cerevisiae*, sin embargo, la presencia de vainillina o ácido ferúlico no produjo diferencias significativas en el crecimiento de la levadura (Figura 4.22). Por otro lado, el crecimiento de *S. cerevisiae* en microcultivos no se vio afectado por las concentraciones de CuSO_4 utilizadas. La máxima concentración ensayada fue 4 mM ya que

concentraciones superiores produjeron interferencias en el método sistemático de detección de actividad lacasa.

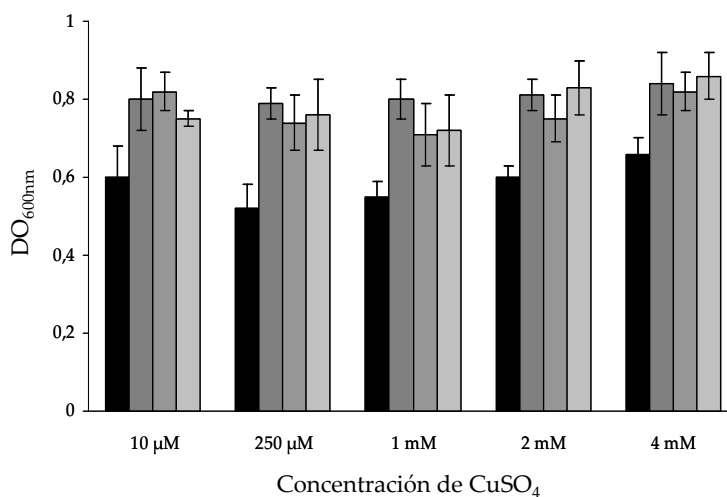


Figura 4.22. Efecto de la composición del medio de expresión (24 h) en el crecimiento (densidad óptica) de transformantes de *S. cerevisiae* que expresan lacasa en placas de 96 pocillos. Medio de cultivo en ausencia de etanol (■), en presencia de 25 g/L de etanol (■), en presencia de 25 g/L de etanol y 250 μM de ácido ferúlico (▒) y en presencia de 25 g/L de etanol y 250 μM de vainillina (□). Se muestran los valores medios de 5 experimentos y los límites de confianza del 95 %.

4.2.1.2. Efecto de las condiciones de inducción en la producción de lacasa

No se consiguió detectar actividad lacasa en los cultivos de *S. cerevisiae* en ausencia de etanol. La adición de CuSO₄ al medio de expresión incrementó significativamente la producción de lacasa cuando fue añadido en rango mM (1- 4).

Por otro lado, el empleo de DMP como sustrato en la detección de actividad lacasa permitió un aumento significativo de la respuesta en microplaca con respecto al ABTS (Figura 4.23). De manera que se detectó actividad lacasa en cultivos con CuSO₄ por debajo del rango mM (250 μM). En presencia de etanol y CuSO₄ 2-4 mM la actividad alcanzó valores de 3 mU/L.

La presencia de ácido ferúlico o vainillina en el medio no indujo la producción de lacasa. Por el contrario, la actividad detectada con ABTS descendió notablemente, no viéndose tan afectada la actividad medida con DMP.

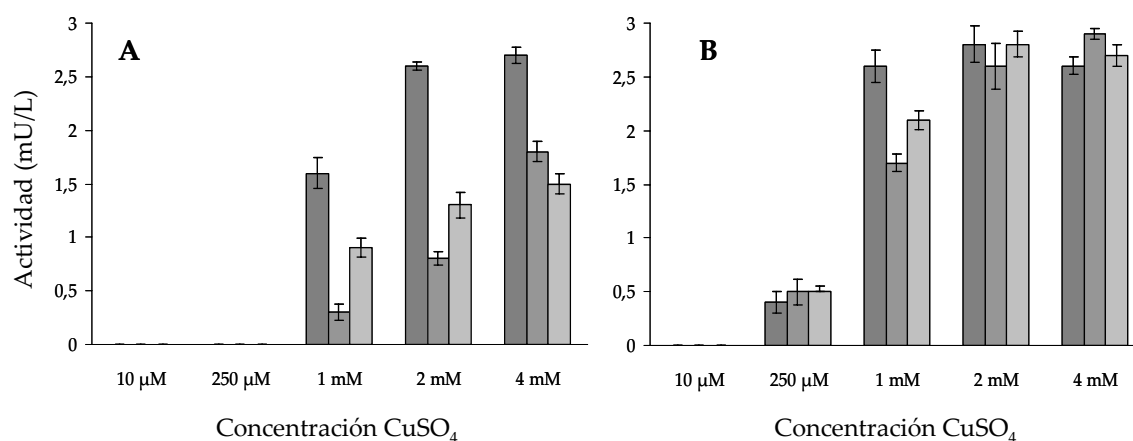


Figura 4.23. Efecto de las condiciones de inducción en la producción de lacasa por transformantes de *S. cerevisiae* crecidos en placas de 96 pocillos. Actividad lacasa medida con ABTS (A) y con DMP (B). Medio de expresión con 25 g/L de etanol (■), con etanol y 250 µM de ácido ferúlico (▒) y con etanol y 250 µM de vainillina (□). Se muestran los valores medios de 5 experimentos independientes y los límites de confianza del 95 %.

En vista de los resultados obtenidos, los experimentos de evolución molecular dirigida de la lacasa de *P. cinnabarinus* se realizaron con 25 g/L de etanol y 2 mM de CuSO₄ en el medio de expresión.

4.2.2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LA LACASA DE *P. cinnabarinus*

4.2.2.1. Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima II

Se construyeron dos genotecas mediante PCR mutagénica con Mutazima II bajo dos condiciones de reacción diferentes, variando la concentración de ADN molde (pJRoC30- α -PcL), para obtener dos tasas de mutación distintas (media y baja) (ver Tabla 3.10 de Materiales y Métodos). Una vez transformadas las células de *S. cerevisiae*, se realizó la exploración sistemática de actividad lacasa (*high-throughput screening*) de unos 1000 clones por genoteca, de acuerdo con el apartado 3.2.7.3.1 de Materiales y Métodos. Los paisajes resultantes del ensayo sistemático de actividad de los clones explorados de las dos genotecas se muestran en la Figura 4.24.

Tras los *re-screenings* de las dos librerías se seleccionaron cuatro mutantes por su elevada actividad lacasa en comparación con el resto de los clones de la genoteca explorada. La actividad de cada mutante con respecto a la actividad del parental y las mutaciones de cada uno de ellos (incluyendo las mutaciones silenciosas) se resumen en la Tabla 4.9.

Se seleccionaron 3 mutantes de la genoteca de índice de mutación medio. El mejor mutante seleccionado, 1D12, presentó una mutación beneficiosa en el pre péptido del factor α , A(α 9)D, que supuso una mejora de actividad de 12,6 veces respecto al parental. El segundo mutante seleccionado fue el mutante 3D3, con una mejora de actividad total de 7,3 veces con respecto al parental, que presentó dos mutaciones beneficiosas, R(α 2)S y S(α 58)G, en el pre y propéptido del factor α , respectivamente. Por último, el mutante 5F7 mostró un aumento de actividad de 4,5 veces con respecto al parental debido a una única mutación, P394H, en la secuencia de la proteína madura.

De la librería de bajo índice de mutación se seleccionó el mutante 3G10 con una mejora respecto a α -PcL de 2,2 veces y una sola mutación (L46I) en la secuencia de la proteína madura.

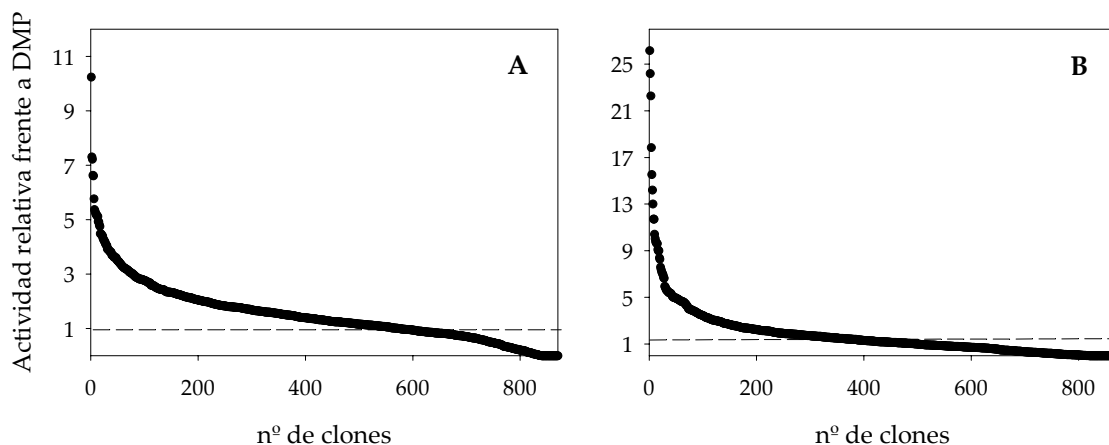


Figura 4.24. Paisajes del ensayo sistemático de exploración de actividad lacasa (*high-throughput screening*) de los mutantes obtenidos en la 1ª generación de evolución dirigida de α -PcL. Perfiles de las genotecas de índice de mutación bajo (A) y medio (B). La actividad de los clones (relativa al parental) se representa en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental.

Se realizó, además, un segundo *re-screening* adicional de termoestabilidad (ver apartado 3.2.7.3.1 de Materiales y Métodos) con el fin de seleccionar no sólo los clones con mayor actividad lacasa, sino también aquéllos que secretasen una lacasa más resistente a altas temperaturas (60 °C). Los resultados fueron coincidentes a los obtenidos en el segundo *re-screening* de actividad, resultando los clones 1D12, 3D3, 5F7 y 3G10 los que produjeron una lacasa más termoestable, además de poseer también mayor actividad (Tabla 4.10).

Tabla 4.9. Mutaciones del proceso de evolución dirigida. Mutación introducida (●), mutación acumulada (■), mutación silenciosa (símbolos abiertos y subrayado). X(αn)X Mutación en el péptido señal (PRE-PEP, prepeptido, PRO-PEP, prepeptido del factor α), PRO, proteína madura

	Aumento respecto al parental (ABTS)	PRE-PEP	PROT	PRE-PEP	PRO-PEP	PROT	PROT	Sitio corte pep señal	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT	PROT
Mutante (generación)		A(α9)D	S409S	R(α2)S	S(α58)G	D141D	P394H	L46I	F(α48)S	E(α86)G	D341N	S135G	P34P	N336N	A361A	T295T	N208S	L457L	I453V	D490G	N227N	I(α33)I	N12N	T295T
		C26A GCT/ GAT	C122T AGC/ AGT	A6T AGA/ AGT	A172G AGC/ GGC	C426T GAC/ GAT	C118A CCC/ CAC	C136A CTC/ ATC	T143C TTC/ TCC	A257G GAG/ GGG	G1021A GAC/ AAC	A403G AGC/ GGC	T102C CCT/ CCC	C1008T AAC/ AAT	G1083A GCG/ CCA	T885C ACT/ ACC	A623G AAC/ AGC	C1371T CTC/ CTT	A1357G ATT/ GTT	A1469G GAT/ GGT	C681T AAC/ AAT	T99C ATT/ ATC	T36C AAT/ AAC	T885C ACT/ ACC
1D12 (1ª G)	12,6	●	○																					
3D3 (1ª G)	7,3			●	●	○																		
5F7 (1ª G)	4,5						●																	
3G10 (1ª G)	2,3							●																
10A7 (2ª G)	17,1	■			■		■		●	●														
19C8 (2ª G)	11,7			■	■		■				●													
20C7 (2ª G)	11,1			■			■	■																
1F10 (2ª G)	9,5	■					■					●												
1C9 (2ª G)	8,7	■					■						○	○	○									
2D8 (2ª G)	8,7			■	■	□	■									○								
7A9 (3ª G)	3,7	■			■		■		■	■	■						●	○						
5D3 (3ª G)	1,9	■			■		■	■	■	■										○				
9C3 (3ª G)	1,7	■			■		■	■	■	■											○	○	○	○
17B7 (3ª G)	1,3	■			■		■		■	■									●	●				

Tabla 4.10. Resultados del 2º *re-screening* de termoestabilidad realizado con mutantes seleccionados de la 1ª generación de evolución dirigida de α -PcL. Se indican las mejoras en termoestabilidad y actividad respecto al parental y la relación entre ambos valores.

Mutante	Termoestabilidad	Actividad	Termoest./act.
1D12	17,0	12,6	1,4
3D3	10,0	7,3	1,4
5F7	5,2	4,5	1,2
3G10	2,4	2,2	1,1
5C4	2,1	1,9	1,1
7B5	1,5	1,4	1,1
5G12	1,5	1,4	1,1

4.2.2.2. Segunda generación: PCR mutagénica con Taq/MnCl₂ y barajado *in vivo* de ADN

En el segundo ciclo de evolución dirigida se emplearon dos estrategias diferentes de generación de diversidad génica en el mismo ciclo: la mutagénesis inducida y la recombinación génica.

Se tomaron como parentales los cuatro mejores mutantes seleccionados en la primera generación. Estos fueron sometidos por separado a una nueva reacción de PCR mutagénica con Taq/MnCl₂ (ver Tabla 3.11 de Materiales y Métodos) para introducir nuevas mutaciones puntuales. A continuación, los diferentes productos de PCR se recombinaron mediante barajado *in vivo* de ADN (Figura 4.25).

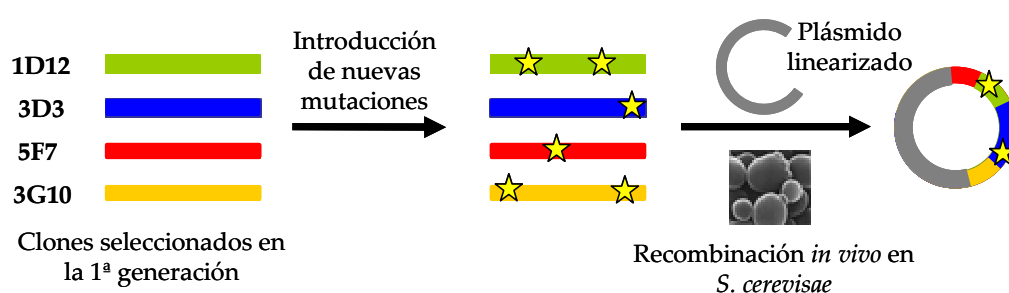


Figura 4.25. Esquema de la estrategia seguida en el 2º ciclo de evolución dirigida.

Se exploraron 2000 clones en el ensayo sistemático de actividad (Figura 4.26). Tras dos *re-screenings* consecutivos se seleccionaron 6 clones que presentaron mejoras de actividad lacasa en microcultivo desde 8,7 a 17 veces con respecto al mejor mutante de la primera generación (1D12), utilizado como parental en el ensayo sistemático de exploración de

actividad. Todos los mutantes seleccionados presentaron la mutación P394H, en la secuencia de la proteína madura, procedente de la generación anterior, además de diferentes combinaciones de otras mutaciones (Tabla 4.9). En el mejor de ellos, 10A7, se conservaron tres mutaciones de los parentales y aparecieron dos nuevas localizadas en el propéptido del factor α , F(α 48)S y E(α 86)G. En el mutante 19C8, con un incremento de actividad total de 11,7 veces, apareció una nueva mutación beneficiosa en la secuencia de la proteína madura (D341N), además de otras tres provenientes de la primera generación. El mutante 20C7, muy similar al anterior en mejora de actividad, acumuló tres mutaciones de la generación anterior. En el mutante 1F10, además de dos mutaciones acumuladas de la generación anterior, apareció la mutación S135G, y presentó una mejora de actividad total de de 9,5 veces respecto a la actividad del parental. Los mutantes 1C9 y 2D8, ambos con 8,7 veces más de actividad que el parental, no mostraron ninguna nueva mutación beneficiosa, sino combinaciones de mutaciones seleccionadas en la primera generación.

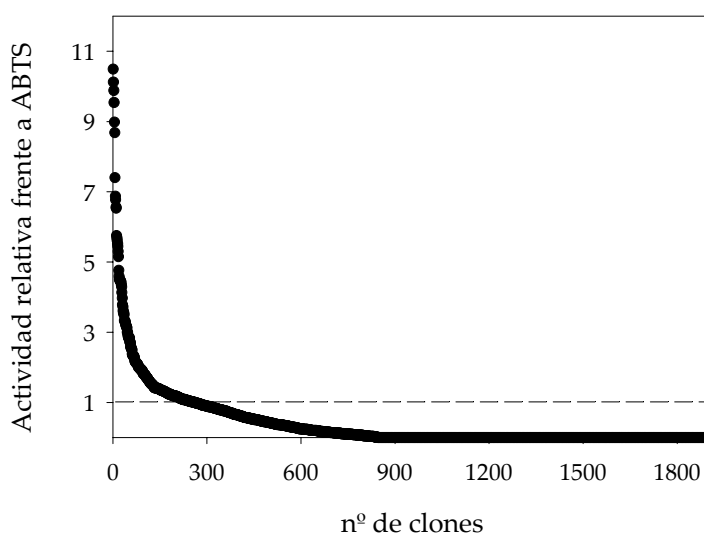


Figura 4.26. Paisaje del ensayo sistemático de exploración de actividad lacasa de la 2ª generación. La actividad de los clones de la librería de mutantes (con respecto al mejor mutante de la 1ª generación) se representa en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental.

4.2.2.3. Tercera generación: PCR mutagénica con Taq/MnCl₂ y barajado *in vivo* de ADN

Se tomaron los mejores clones de la segunda generación como parentales para un tercer ciclo de evolución dirigida y se sometieron a PCR mutagénica con Taq/MnCl₂ en las mismas condiciones aplicadas en el segundo ciclo

(Tabla 3.11 de Materiales y Métodos). Posteriormente, se realizó el barajado *in vivo* de los productos de PCR.

En el ensayo sistemático de actividad se exploraron cerca de 2000 clones de la genoteca (Figura 4.27 A y B). Como resultado del *screening* y los posteriores *re-screenings*, se seleccionaron cuatro mutantes con mejoras de actividad entre 1,3 y 4 veces la actividad del parental (mejor mutante de la segunda generación, 10A7) medida con ABTS (Tabla 4.9).

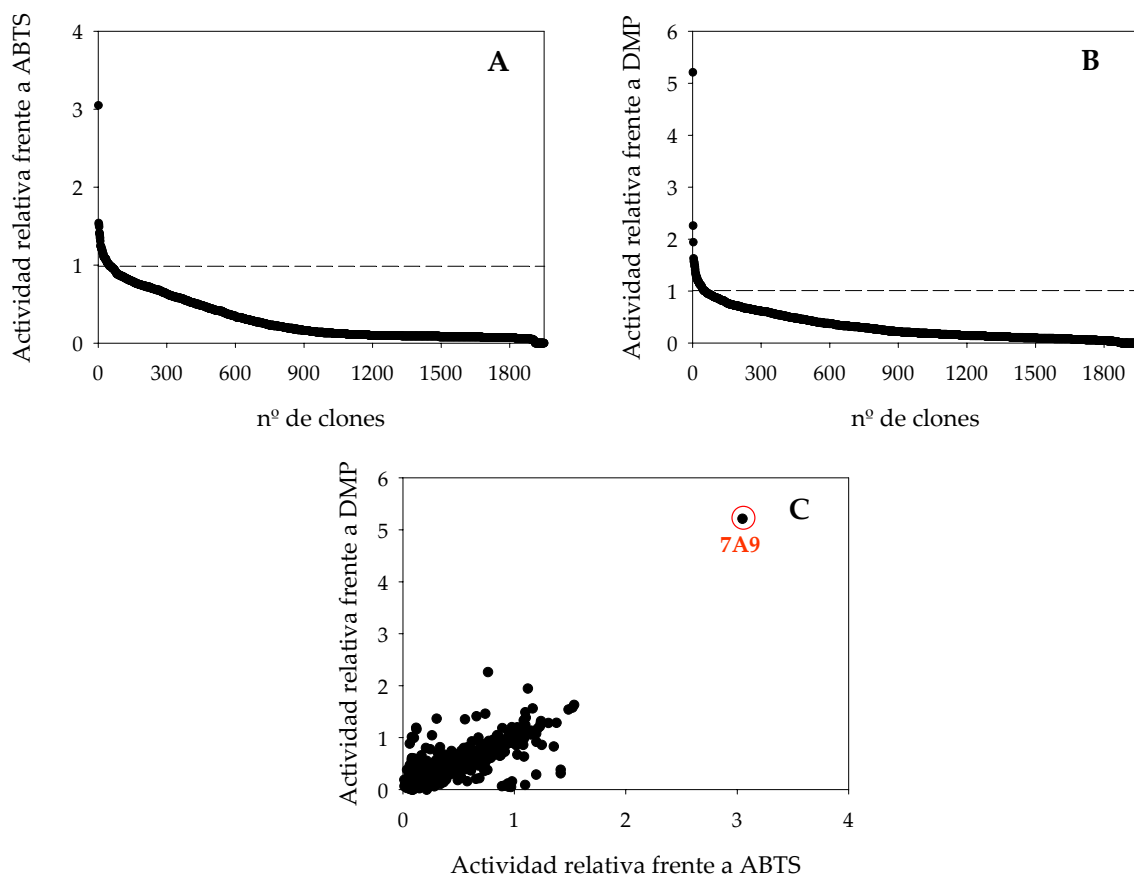


Figura 4.27. Paisajes del ensayo sistemático de exploración de actividad lacasa de la 3ª generación. La actividad de los clones de la librería (con respecto al mejor mutante de la 2ª generación) medida con ABTS (A) y DMP (B) se representa en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental. (C) Representación de la actividad lacasa con ABTS frente a DMP.

Los cuatro mutantes seleccionados mostraron las mutaciones A(α 9)D, F(α 48)S, S(α 58)G, E(α 86)G y P394H surgidas en la primera y segunda generación. Además de éstas, el mejor mutante de esta generación, 7A9 incorporó la mutación D341N aparecida en la segunda generación y mostró una nueva mutación (N208S) en la secuencia de la proteína madura. Los mutantes 5D3 y 9C3, con mejoras de actividad de 1,9 y 1,7, respectivamente,

presentaron las mismas mutaciones beneficiosas mencionadas anteriormente, e incorporaron además la mutación, L46I surgida en la primera generación. Por último, el mutante 17B7 mostró dos nuevas mutaciones en la secuencia de la proteína madura, I453V y D490G.

La actividad total del mutante 7A9 detectada durante el *screening* con los dos sustratos ensayados (ABTS y DMP), fue significativamente superior a la del resto de los clones de su generación (Figura 4.27 C). Estos resultados fueron corroborados en los dos *re-screening* sucesivos, obteniendo finalmente una mejora de actividad respecto al parental de unas 4 veces medida con ABTS, y unas 10 veces, medida con DMP.

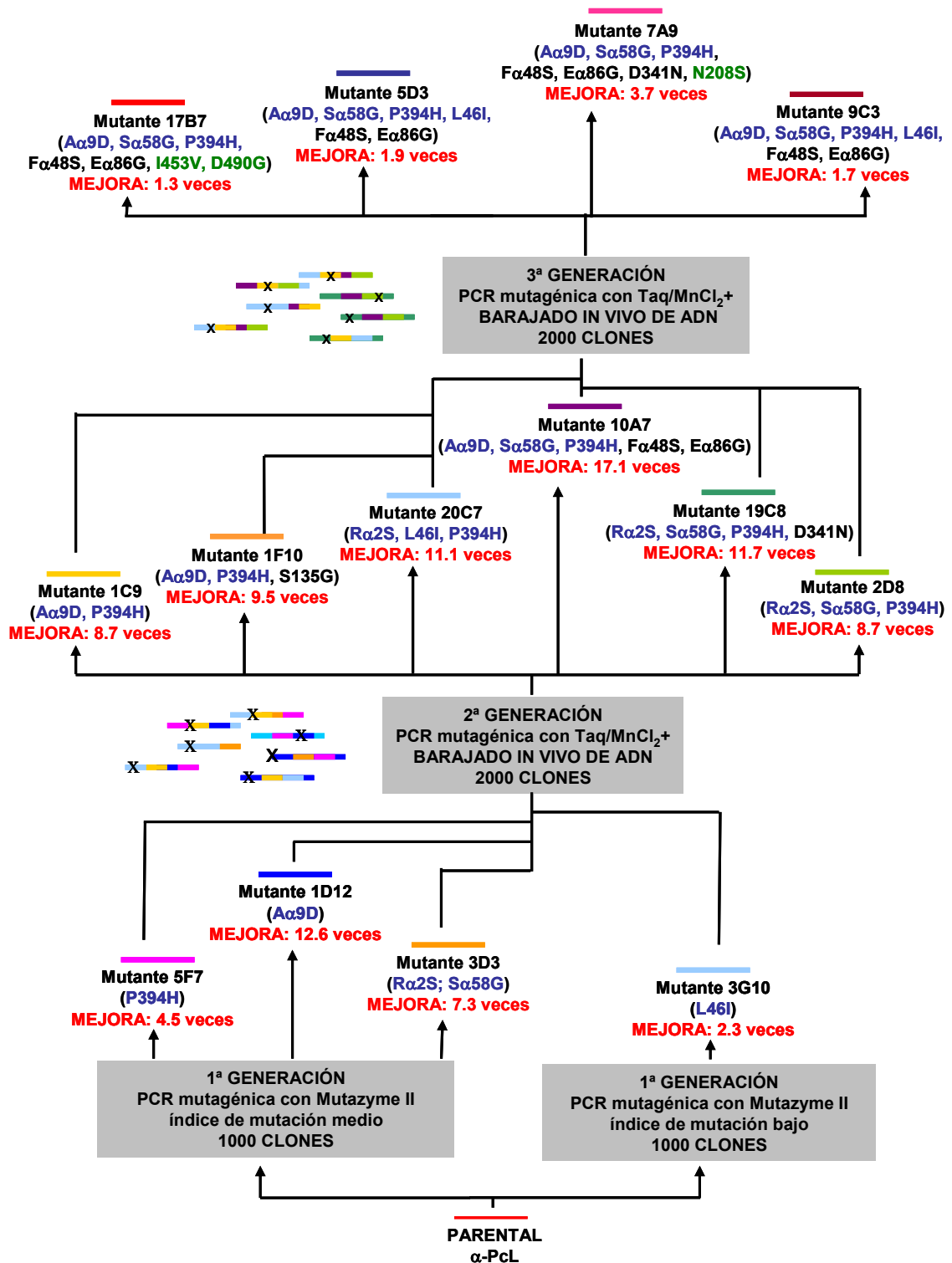


Figura 4.28. Esquema general del proceso de evolución en el laboratorio de la lacasa de *P. cinnabarinus*. Se indican los mutantes seleccionados en cada generación y las mutaciones beneficiosas responsables de los aumentos de actividad detectados en el HTP-screening. Las mutaciones silenciosas no están incluidas en el esquema.

4.2.3. MUTAGÉNESIS DE LOS RESIDUOS R(α 2)S Y A240P MEDIANTE IVOE

En el mejor mutante de la tercera generación, 7A9, se introdujeron dos mutaciones: i) la mutación R(α 2)S, en la secuencia del prepeptido del factor α , que se había perdido durante el proceso evolutivo en la tercera generación; y ii) la mutación A240P en la secuencia de la proteína madura, mutación beneficiosa seleccionada durante el proceso evolutivo de la lacasa de PM1 que comparte un 73 % de identidad de secuencia con la lacasa de *P. cinnabarinus*. La introducción de estas dos mutaciones se llevó a cabo a través de la estrategia de IVOE (*In Vivo Overlap Extension*) (Alcalde *et al.*, 2006), que se basa en la capacidad de la levadura de reensamblar fragmentos de ADN (producidos *in vitro* y mutagenizados en los codones de interés) fusionando el gen con el plásmido linearizado, y evitando así un paso intermedio de ligación *in vitro* (Figura 4.29).

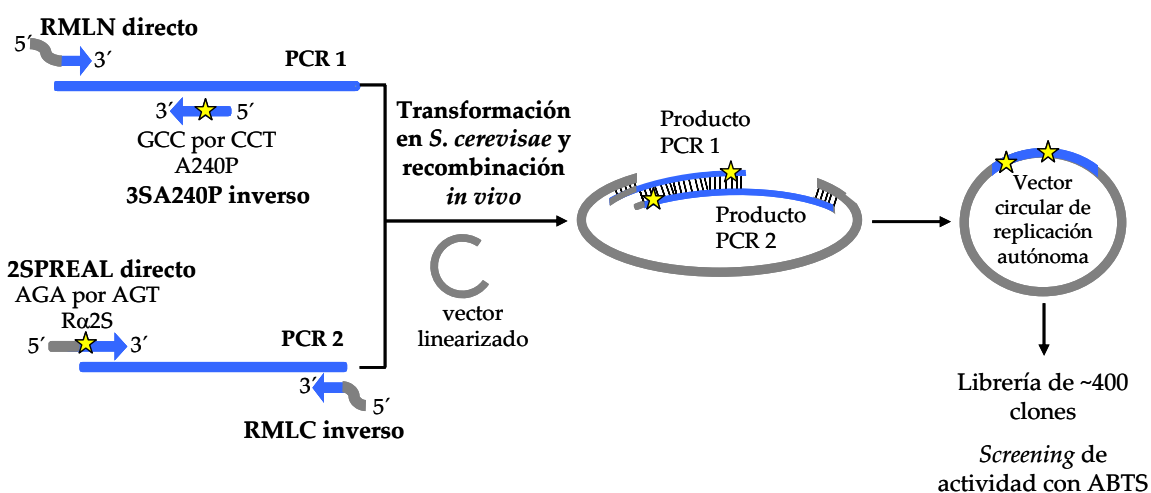


Figura 4.29. Estrategia de IVOE para la mutagénesis de los residuos R(α 2)S y A240P. Para la primera reacción de PCR (PCR 1), se diseñó una extensión en el extremo N-terminal con 40 pb de homología con el extremo BamHI del vector linearizado. Para la segunda reacción de PCR (PCR 2), se diseñó una extensión en el extremo C-terminal con 66 pb de homología con el extremo XhoI del vector linearizado. La mutagénesis se llevó a cabo usando oligonucleótidos cebadores con 22 pb antes de la mutación y 18 pb después.

Después de explorar unos 400 clones, ninguno presentó una mejora significativa de actividad con respecto al parental 7A9. Tras secuenciar varios de los clones negativos (con menor actividad que 7A9) se comprobó que únicamente contenían la mutación A240P. La secuenciación de otros clones seleccionados con similar actividad que el parental, puso de

manifiesto la ausencia de cualquiera de las dos mutaciones de interés. Es decir, su secuencia fue la misma que la del parental 7A9.

4.2.4. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA VARIANTE 7A9

4.2.4.1. Optimización de las condiciones de producción

Como paso previo a la producción de la variante 7A9 en matraces, se optimizaron las condiciones de incubación.

4.2.4.1.1. Efecto de la concentración de cobre

Se ensayaron diferentes concentraciones de CuSO_4 en el rango mM para determinar la concentración óptima en el medio de expresión, que indujera la mayor producción de enzima sin afectar al crecimiento de *S. cerevisiae*. La producción de lacasa alcanzó el máximo con la concentración de CuSO_4 4 mM, que a su vez no afectó excesivamente al crecimiento celular de la levadura (Figura 4.30 A y B). Concentraciones de cobre superiores a 4 mM causaron una notable inhibición del crecimiento, lo cual se tradujo en un descenso de la actividad lacasa presente en el medio de cultivo.

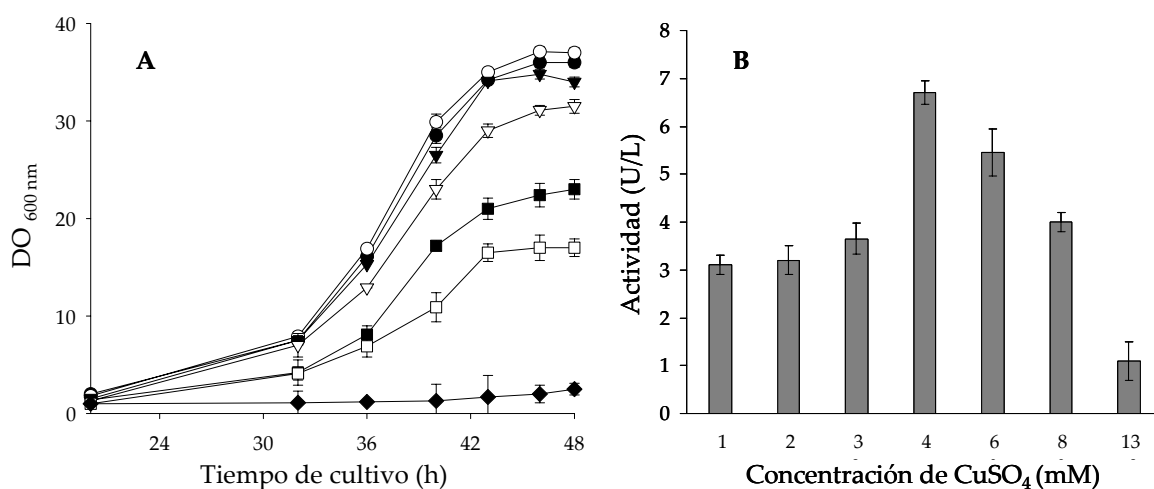


Figura 4.30. Efecto de la concentración de CuSO_4 en el crecimiento celular (A) (● 1, ○ 2, ▼ 3, ▽ 4, ■ 6, □ 8 y ◆ 13 mM) y en la producción de lacasa (B). Incubación realizada en matraces de 100 mL a 30 °C. Se muestran los valores medios y los límites de confianza del 95 %.

4.2.4.1.2. Efecto de la temperatura

Se estudió el efecto de la disminución de la temperatura en la secreción de lacasa por *S. cerevisiae*, incubando las células transformadas a 20 °C

además de a 30 °C (temperatura habitual). En el cultivo a 20 °C se observó una ralentización del crecimiento, consiguiéndose el máximo de crecimiento aproximadamente 2 días después que a 30 °C. Sin embargo, una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, la actividad lacasa detectada en el medio de cultivo fue el doble en los cultivos incubados a 20 °C que en los incubados a 30 °C (Figura 4.31).

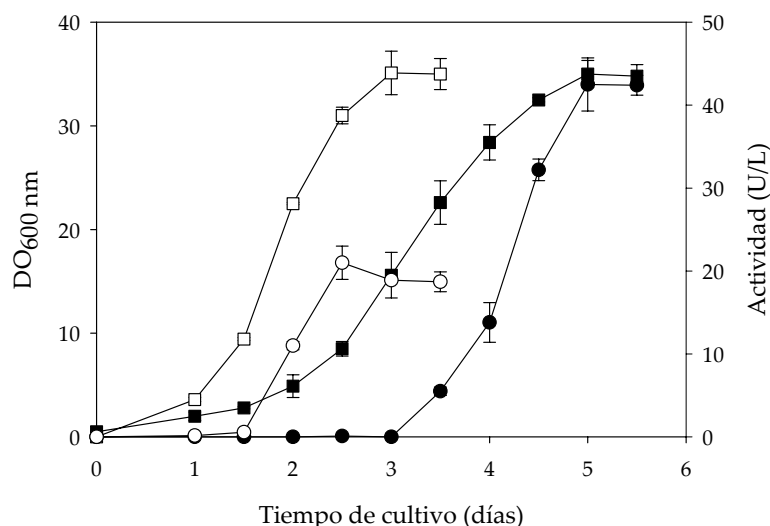


Figura 4.31. Efecto de la temperatura de incubación en el crecimiento celular (cuadrados) y en la actividad lacasa (círculos) (20 °C (símbolos cerrados) y 30 °C (símbolos abiertos)). Se muestran los valores medios y los límites de confianza del 95 %.

En consonancia con los resultados obtenidos, la producción de la variante 7A9 se llevó a cabo en cultivos de 200 mL en matraz con una concentración final de CuSO₄ de 4 mM y a una temperatura de 20 °C. El cultivo se paró tras 5 días de inducción, cuando tanto el crecimiento celular como la actividad lacasa se estacionaron (DO₆₀₀ = 35; actividad lacasa = 40 U/L).

4.2.4.2. Purificación de la variante 7A9

La variante 7A9 fue purificada según el protocolo indicado en el apartado 3.2.10.3 de Materiales y Métodos.

El extracto crudo se centrifugó y concentró por ultrafiltración hasta un volumen de 45 mL para posteriormente someterlo a un paso de cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución (columna *HiTrap-Q*, Figura 4.32). Las fracciones con actividad lacasa se dializaron, se concentraron y se cargaron en una segunda columna cromatográfica (*Resource-Q*, Figura 4.33), esta vez de intercambio aniónico de alta

resolución. El rendimiento final del proceso de purificación fue del 27,4 %, obteniéndose 1,5 mg totales de lacasa pura (Tabla 4.11).

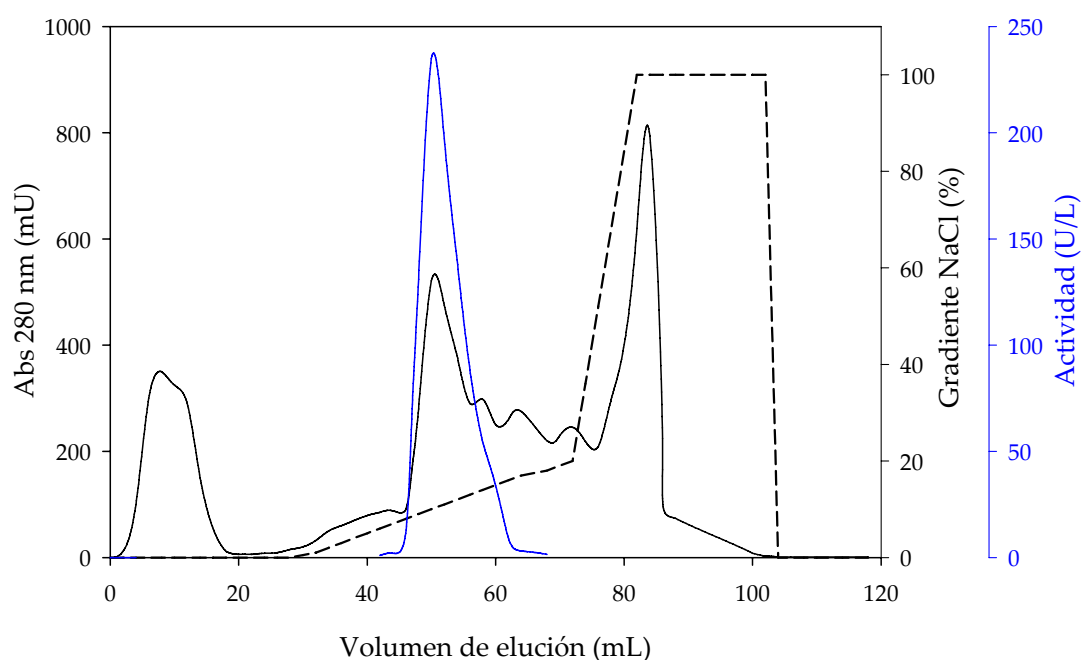


Figura 4.32. Cromatografía de intercambio iónico de baja resolución. Se muestran los perfiles correspondientes a la actividad lacasa con ABTS (U/L) (—); proteína (Abs a 280 nm) (—) y gradiente de NaCl (%) (---).

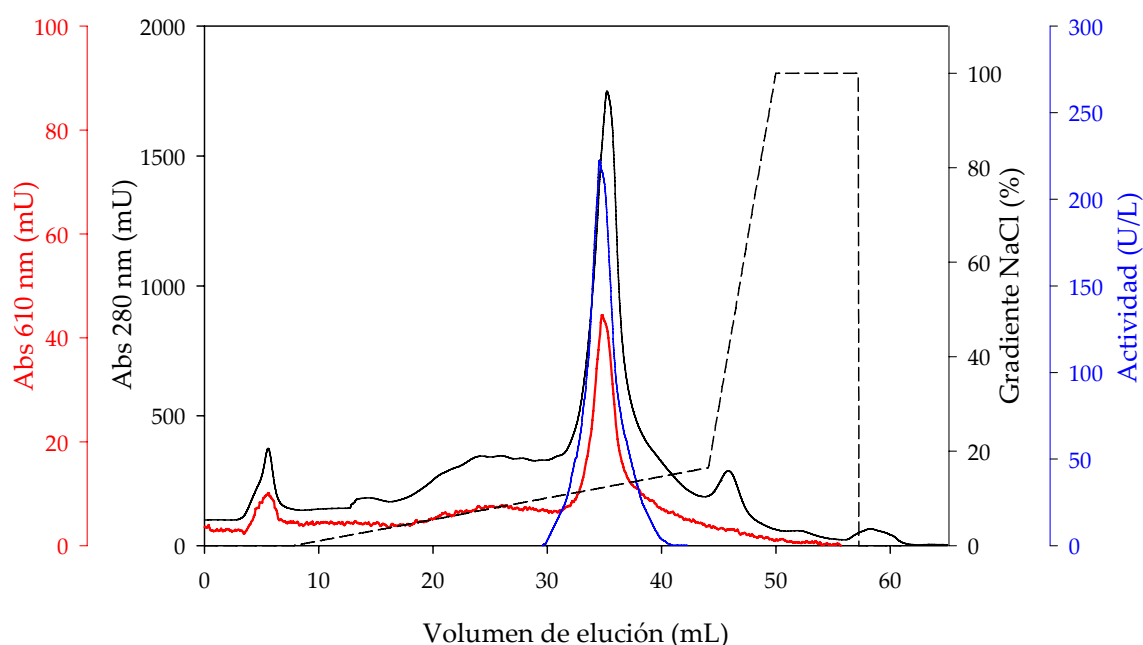


Figura 4.33. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. Se muestran los perfiles correspondientes a la actividad lacasa con ABTS (U/L) (—); proteína (Abs a 280 nm) (—), Abs a 610 nm (—) y gradiente de NaCl (%) (---).

Tabla 4.11. Resumen del proceso de purificación de la variante 7A9.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total con ABTS (U)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1600,0	73,6	64,0	100,0
Concentración	47,0	59,2	55,5	86,6
<i>HiTrap-Q</i>	57,8	9,0	22,2	31,6
<i>Resource-Q</i>	31,5	1,5	17,6	27,4

En la Figura 4.34 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes, de las fracciones con actividad lacasa, obtenidas en los diferentes pasos de purificación de la variante 7A9. Tras el último paso de purificación, se pudo obtener una única banda correspondiente a la variante de lacasa purificada.

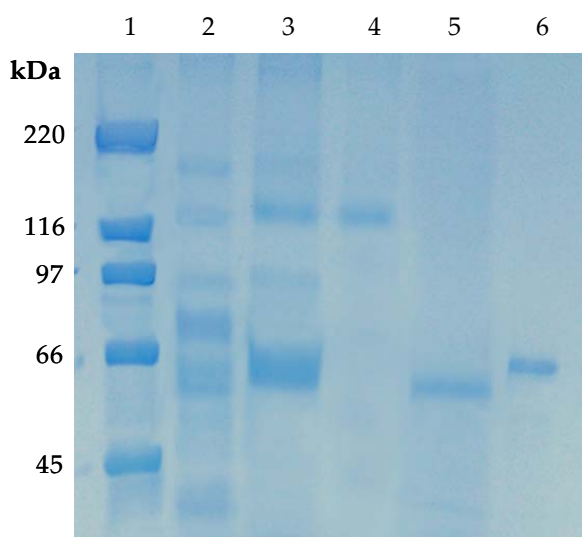


Figura 4.34. Electroforesis SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación de la variante 7A9. 1) Marcador de peso molecular de proteínas; 2) extracto crudo concentrado después de ultrafiltración bajo presión con N₂; 3) Después de cromatografía de baja resolución en columna de intercambio aniónico débil (*HiTrap-Q*); 4) Después de cromatografía de alta resolución en columna de intercambio aniónico fuerte (*Resource-Q*); 5) Misma fracción que 4 tras la desglucosilación con N-desglucosidasa PNGasaF; 6) Lacasa salvaje de *P. cinnabarinus*.

4.2.5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA VARIANTE 7A9

4.2.5.1. Electroforesis SDS-PAGE y desglicosilación

La masa molecular de la variante 7A9 expresada en *S. cerevisiae* fue de aproximadamente 120 kDa (carril 4, Figura 4.34). Su N-desglicosilación redujo su masa molecular hasta 60 kDa aproximadamente (carril 5), valor ligeramente inferior a la masa molecular de PcL salvaje estimada en 65 kDa (carril 6,). Estos datos ponen de manifiesto que la lacasa secretada por la levadura se encuentra hiperglicosilada aproximadamente en un 50 % de su masa total.

4.2.5.2. Cálculo de parámetros cinéticos

La eficiencia catalítica en la oxidación del ABTS de la variante 7A9 presentó una mejora de 5,7 veces con respecto a la lacasa salvaje de *P. cinnabarinus*, gracias al significativo aumento de afinidad por este sustrato. Por el contrario, no se mejoró la oxidación de DMP, siendo la afinidad por el DMP la mitad en la variante 7A9.

Tabla 4.12. Constantes catalíticas de 7A9 y PcL salvaje frente a los sustratos ABTS y DMP.

	ABTS			DMP		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
7A9	20	27	1325	89	15	168
PcL salvaje	162	38	234	41	22	540

4.2.5.3. Estabilidad frente a temperatura

La termoestabilidad en medio acuoso de la variante 7A9 cambió notablemente con respecto a la lacasa de *P. cinnabarinus* salvaje como consecuencia de la expresión funcional y del proceso evolutivo en *S. cerevisiae*. Mientras que la lacasa obtenida por evolución dirigida mantuvo el 85 % de su actividad tras 24 h de incubación a 40 °C, la lacasa de *P. cinnabarinus* salvaje solo conservó el 57 %.

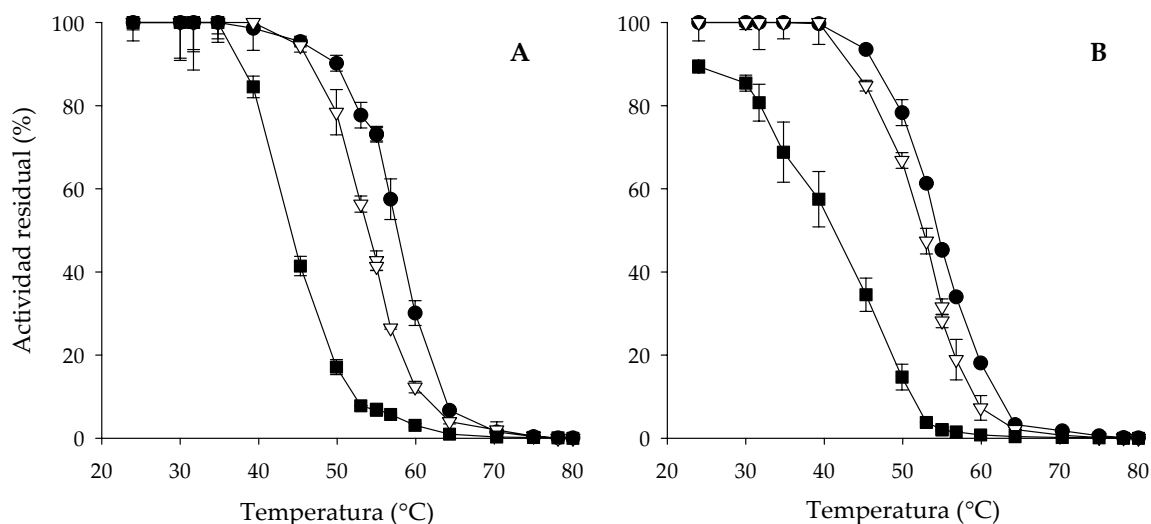


Figura 4.35. Termoestabilidad de la variante 7A9 (A) y PcL salvaje (B) a diferentes periodos de incubación: 2h (●), 4h (▽) y 24h (■). Las actividades se normalizaron respecto a la actividad inicial a temperatura ambiente antes de la incubación. Cada punto representa el valor medio de tres experimentos y los límites de confianza del 95 %.

4.2.5.4. pH óptimo

El perfil de actividad frente a pH se vio desplazado en la variante 7A9, como efecto lateral del proceso de evolución *in vitro*. Así, el pH óptimo de actividad de la lacasa de *P. cinnabarinus* salvaje se situó en 3,0, mientras que en 7A9 se detectó entre 3,0 y 4,0. Notoriamente, a pH 5,0, 7A9 retuvo el 74 % de su actividad, mientras que la lacasa salvaje mantuvo un 52 %.

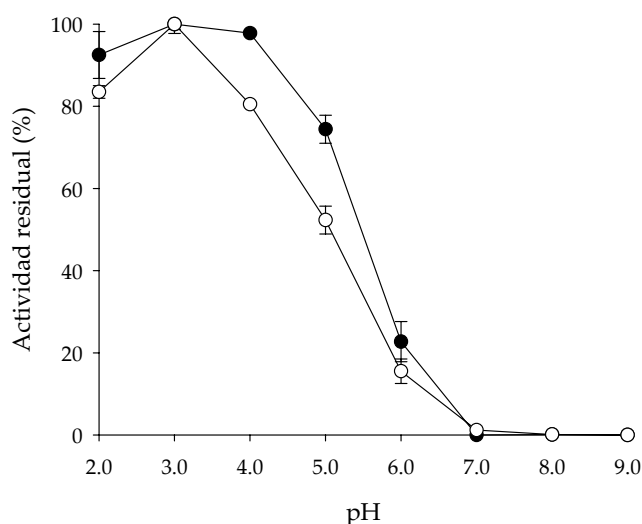


Figura 4.36. Perfiles de actividad a diferentes pHs de 7A9 (●) y PcL salvaje (○). Las actividades se midieron en tampón Britton y Robinson 100 mM ajustado a los diferentes pHs de la medida. La actividad lacasa se representa normalizada con respecto a su valor óptimo de actividad. Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes y los límites de confianza del 95 %.

5. Discusión

5.1. MEDIADORES REDOX DE LACASA DE ORIGEN NATURAL

5.1.1. COMPUESTOS FENÓLICOS RELACIONADOS CON LA LIGNINA

Los compuestos aromáticos ensayados en esta tesis como mediadores naturales de lacasa son compuestos de carácter fenólico relacionados con las unidades fenilpropano (H, G y S) del polímero de lignina, y están por tanto presentes de forma abundante en la naturaleza. Los ácidos *p*-hidroxicinámicos son precursores de la lignina en las plantas vasculares, y están también presentes formando puentes entre la matriz de lignina y hemicelulosas en las plantas herbáceas (Lam *et al.*, 1994). Los aldehídos y cetonas como vainillina o acetosiringona son productos de oxidación del polímero de lignina (Chen *et al.*, 1985), y son por tanto, liberados durante el proceso de su biodegradación por los hongos de podredumbre blanca de la madera. Algunos de estos compuestos aromáticos se han descrito como inductores de la producción de lacasa por hongos ligninolíticos (Herpoël *et al.*, 2000), a pesar de inhibir su crecimiento (De Souza *et al.*, 2004). En nuestro caso, además de no ser tóxicos para el crecimiento del hongo, de acuerdo con resultados anteriores obtenidos con el hongo *Rhizoctonia praticola* (Bollag *et al.*, 1988), han promovido su crecimiento.

5.1.1.1. Actividad antioxidante

En este trabajo se ha demostrado la capacidad de los compuestos fenólicos de origen natural para prevenir el daño oxidativo mediante la “captura” de radicales libres y de otros oxidantes fuertes presentes en el medio, gracias a la cesión de un átomo de hidrógeno (Bors *et al.*, 1987).

Los resultados obtenidos en el ensayo TEAC con dichos compuestos fenólicos pusieron de manifiesto la existencia de dos grupos con actividades antioxidantes bien diferenciadas. Los derivados benzoicos mostraron una actividad antioxidante muy inferior a los derivados de ácidos cinámicos (Marinova *et al.*, 2003). El fuerte carácter antioxidante de los ácidos *p*-hidroxicinámicos (superior al del Trolox) está relacionado con la presencia del doble enlace en su cadena lateral $-(CH=CH-COOH)$ que participaría en la estabilización por resonancia del radical fenoxilo formado (Cuvelier *et al.*, 1992). Esta estabilización resonante explica la facilidad de formación de los radicales fenoxilo, siendo el destino más probable de este radical la colisión

y condensación con otro radical produciendo un dímero que sería capaz de seguir actuando como “secuestrador” de radicales (Graf, 1992).

Las capacidades intrínsecas de donar electrones de los ácidos fenólicos está fuertemente condicionada por la existencia de grupos hidroxilo o metoxilo en posiciones *orto* y *para* de su anillo aromático, que actuarían facilitando la donación de electrones y estabilizando el radical fenoxilo (Marinova *et al.*, 1992; Marinova *et al.*, 1994). El ácido sinápico, con dos grupos metoxilo en el anillo aromático, fue el compuesto fenólico con mayor poder antioxidante, seguido del ácido ferúlico, que posee un sustituyente metoxilo y del ácido *p*-cumárico, sin sustituyentes en el anillo. Los ácidos *p*-hidroxicinámicos son abundantes en semillas y frutos. La resistencia a la peroxidación del aceite de colza, por ejemplo, está relacionada con la elevada concentración de ácido sinápico que actuaría como potente antioxidante (Koski *et al.*, 2003). Del mismo modo, los valores TEAC obtenidos en etanol para acetosiringona y siringaldehído son mayores que los de acetovainillona y vainillina, que poseen un sustituyente metoxilo menos.

Las actividades antioxidantes de los diferentes compuestos fenólicos testados fueron significativamente menores en etanol que en solución acuosa, confirmando la dependencia de la actividad antioxidante del medio en el que se realiza el ensayo (Frankel *et al.*, 1994; Hopia *et al.*, 1996; Pekkarinen *et al.*, 1999). En el caso de los ácidos *p*-hidroxicinámicos, el efecto donador de electrones del grupo cinamato sería responsable de esta diferencia ya que el etanol no favorece la desprotonación de los ácidos cinámicos (pK_a 4-5), mientras que a pH 7,4 estarían totalmente desprotonados (y parcialmente a pH 5,0). Además, puesto que en etanol no existen interferencias de desprotonación, se puede observar mejor el efecto positivo de la presencia de uno o dos grupos metoxilo donadores de electrones en la actividad antioxidante de los ácidos ferúlico y sinápico con respecto al ácido *p*-cumárico. Por último, los compuestos fenólicos poseen un valor de pK_a (Ragnar *et al.*, 2000) suficientemente alto como para ser ignorado a pH fisiológico.

5.1.1.2. Compuestos fenólicos como sustratos de lacasa

El paso limitante en la oxidación de fenoles por lacasa es la transferencia electrónica al sitio de cobre T1, una reacción dirigida fundamentalmente por diferencias en el potencial redox entre el fenol y la lacasa (Daniel *et al.*, 1989; Bogan *et al.*, 1996; Xu, 1996). El efecto donador de electrones de los sustituyentes metoxilo del anillo bencénico, mencionado en el apartado anterior, aumenta la actividad lacasa sobre los derivados fenólicos sustituidos, debido al descenso en su potencial redox. En este sentido, acetosiringona y siringaldehído (dos compuestos de tipo S, con dos sustituyentes metoxilo en el anillo) fueron rápidamente oxidados por la lacasa, y también resultaron ser mediadores de lacasa más rápidos y eficaces en la decoloración de tintes (Camarero *et al.*, 2005). Por el contrario, sus equivalentes de tipo G, acetovainillona y vainillina (con un solo grupo metoxilo), fueron oxidados en menor medida por la lacasa, según indican sus valores de k_{cat} .

La existencia de un doble enlace en la cadena lateral de los ácidos *p*-hidroxicinámicos (cinamato) favorece también la sustracción de un electrón, promoviendo su oxidación por la lacasa, al tiempo que estabiliza el radical. Dentro de este grupo, el ácido sinápico, de tipo S, fue rápidamente oxidado, seguido por el ácido ferúlico, de tipo G, y finalmente el ácido *p*-cumárico, de tipo H. El ácido *p*-cumárico fue oxidado más lentamente por la lacasa que siringaldehído o acetosiringona, revelando que los grupos metoxilo jugarían un papel más importante donando electrones que el doble enlace de la cadena lateral facilitando la sustracción de un electrón. El ácido sinápico, el compuesto con mayor capacidad antioxidante, fue también el mejor sustrato de lacasa de todos los compuestos naturales analizados debido al efecto conjunto de los dos sustituyentes metoxilo en el anillo y el doble enlace de la cadena lateral.

5.1.2. DEMOSTRACIÓN DE LA CAPACIDAD MEDIADORA DE ESTOS COMPUESTOS

Además de la actividad antioxidante de los ácidos *p*-hidroxicinámicos (que requiere su forma reducida), en este trabajo se ha demostrado la capacidad de estos compuestos de origen natural para promover (una vez oxidados por lacasa) la oxidación de PAHs, colorantes y lípidos insaturados, en los denominados sistemas lacasa-mediador. El papel de los ácidos *p*-

hidroxicinámicos en la naturaleza estará modulado por las condiciones ambientales que gobernarán el fino balance de sus reacciones de oxidoreducción. En reacciones enzimáticas de interés biotecnológico y medioambiental, el balance entre las formas reducida y oxidada de estos fenoles naturales está dirigida por la formación enzimática de radicales fenoxilo que actúan como eficientes mediadores redox en la degradación de sustratos diana tales como contaminantes aromáticos en sistemas lacasa-mediador.

5.1.2.1. Degradación de PAHs

Eficacia de los mediadores naturales. Se han demostrado las capacidades de los compuestos fenólicos relacionados con la lignina, vainillina, acetovainillona, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico, para mediar la transformación de PAHs por lacasa. Los resultados obtenidos con ácido *p*-cumárico son especialmente relevantes ya que los elevados porcentajes de transformación obtenidos con lacasa y este mediador son similares o incluso superiores a los obtenidos en presencia de los mediadores artificiales ABTS o HBT (Collins *et al.*, 1996; Majcherczyk *et al.*, 1998). Mientras que el ácido ferúlico y especialmente el ácido *p*-cumárico promovieron significativamente la oxidación de antraceno y benzo[a]pireno por lacasa, la presencia de derivados fenólicos dimetoxilados como acetosiringona y siringaldehído no aumentó significativamente su oxidación, y en el caso de ácido sinápico incluso la inhibió. La eficiencia catalítica de la lacasa de *P. cinnabarinus* oxidando los ácidos sinápico, ferúlico y *p*-cumárico (4,54, 1,77 y 0,01 s⁻¹ μM⁻¹, respectivamente) está inversamente relacionada con las capacidades de estos compuestos para promover la degradación de PAHs, sugiriendo mejores habilidades mediadoras para los peores sustratos de lacasa. Aquí entra en juego la importancia del balance entre estabilidad y reactividad de las especies oxidadas (radicales fenoxilo) (d'Acunzo *et al.*, 2003). Las rápidas reacciones de acoplamiento de estos ácidos (Daquino *et al.*, 2006), sobre todo del ácido sinápico (cuyos radicales fenoxilo poseen una elevada tendencia al acoplamiento β-β') podrían estar implicadas en la formación de intermediarios debido a reacciones de acoplamiento de los radicales de ácido entre sí, o de éstos con los radicales del PAH (Itoh *et al.*, 2000). Por otro lado, el potencial redox del ácido *p*-cumárico es mayor (0,8 V) comparado con los aproximadamente 0,7 y 0,6 V del ácido ferúlico y ácido sinápico, respectivamente (Lin *et al.*, 1998). La mayor capacidad

oxidativa de los radicales del ácido *p*-cumárico parece determinante en la oxidación de PAHs.

Lacasa-PCU: efecto de la concentración de mediador. La transformación óptima de antraceno por el sistema lacasa y ácido *p*-cumárico se obtuvo con tan solo dos veces más de éste mediador que de antraceno, frente a las 20 ó 40 veces más de mediadores fenólicos que utilizan otros autores en la degradación del fungicida ciprodinil o de otros PAHs (Johannes *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002). Concentraciones mayores de mediador sí incrementaron notablemente la formación de 9,10-antraquinona, ya que son necesarios varios pasos de oxidación para transformar un PAH en su correspondiente quinona. El porcentaje de 9,10-antraquinona recuperada (50 % de la concentración de antraceno inicial), junto con el descenso de la misma obtenido tras largos periodos de incubación (superior a 48 h), indica que la quinona no es el producto final de la reacción, y por lo tanto, podría ocurrir una transformación posterior por el sistema lacasa-mediador. Sin embargo, en las condiciones de reacción empleadas no se pudieron identificar productos de polimerización u oxidación de la 9,10-antraquinona, como el ácido 2-(2'-hidroxibenzo)-benzoico o el ácido ftálico, formados tras su oxidación y posterior apertura del anillo (Hammel *et al.*, 1991; Cajthaml *et al.*, 2002). Por otro lado, la identificación como antrona del otro producto obtenido en la degradación de antraceno por lacasa y ABTS, coincide con lo descrito durante dicha oxidación por peroxidasas ligninolíticas como paso previo a la formación de 9,10-antraquinona (Baborova *et al.*, 2006; Eibes *et al.*, 2006).

Productos de oxidación. Durante la oxidación de benzo[a]pireno por la lacasa de *P. cinnabarinus* en presencia de ácido *p*-cumárico, ABTS o HBT se generaron las benzo[a]pireno 1,6-, 3,6- y 6,12-quinonas, de acuerdo con lo descrito en la oxidación electroquímica (Jeftic *et al.*, 1969) y enzimática de este PAH (Haemmerli *et al.*, 1986; Rama *et al.*, 1998). El hecho de que sean productos minoritarios de la reacción estaría en concordancia con su condición de compuestos intermediarios de la completa oxidación de PAHs por oxidorreductasas ligninolíticas como MnP (Steffen *et al.*, 2003), aunque no se detectaron los productos de oxidación posteriores.

Por otro lado, el principal producto acumulado durante la oxidación de benzo[a]pireno por lacasa y ABTS es un intermediario de la ruta de formación de dichas quinonas, estabilizado gracias al tampón acetato sódico utilizado en la reacción. El radical catiónico de benzo[a]pireno, producido

por la oxidación con lacasa y ABTS, sufriría el ataque nucleofílico de los aniones acetato (Chen *et al.*, 2000), dando lugar al derivado 6-benzo[a]pirenil acetato, mucho más estable que el intermediario 6-hidroxibenzo[a]pireno (Jeftic *et al.*, 1969; Haemmerli *et al.*, 1986) (Figura 5.2), produciéndose su acumulación. Esto se confirmó con la ausencia de este producto cuando la reacción se llevó a cabo en tampón citrato sódico.

Como se ha mencionado, la oxidación enzimática de PAHs por la lacasa genera quinonas y ácidos como consecuencia de la ruptura del anillo aromático. Estos metabolitos son más fáciles de mineralizar y más solubles que el PAH de partida, lo que aumentaría su biodisponibilidad en la naturaleza y, consecuentemente, su biodegradación por las poblaciones microbianas autóctonas (Meulenberg *et al.*, 1997).

Toxicidad. Las quinonas formadas son menos tóxicas que su correspondiente PAH. Por ejemplo, la mínima concentración mutagénica de benzo[a]pireno en una línea celular de linfoblastos humanos fue de 14 ng/mL, mientras que ninguna de sus quinonas presentó mutagenicidad, y similares resultados se obtuvieron con criseno y benzoantraceno (Durant *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2003). La formación de quinonas por las oxidorreductasas ligninolíticas, contrasta con la formación de otros metabolitos hidroxilados (óxidos de areno) producidos en reacciones catalizadas por múltiples formas de la citocromo P-450 monooxigenasa de bacterias y hongos. La activación de los óxidos de areno por las epóxido hidrolasas produce, entre otros, 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido que es altamente cancerígeno y mutagénico debido a su capacidad de unirse a las cadenas de ADN (Cerniglia, 1985; Sutherland, 1992; Castaño *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se ha demostrado la capacidad del sistema lacasa-mediador natural para degradar y reducir la toxicidad del PAH benzo[a]pireno empleado como modelo. Se utilizó una batería de test toxicológicos que incluye bacterias, algas y crustáceos, aportando, de esta manera, datos de especies de diferentes niveles de la escala trófica que permiten comprender y evaluar mejor el riesgo medioambiental de estos compuestos. Las algas fueron los organismos más sensibles al benzo[a]pireno, corroborando resultados anteriores de toxicidad de PAHs (Eom *et al.*, 2007). Por otro lado, los valores de CE₅₀ obtenidos para benzo[a]pireno en los sistemas biológicos testados son concordantes con los obtenidos por otros autores (Atienzar *et al.*, 1999; Djomo *et al.*, 2004). Tras la oxidación de benzo[a]pireno con lacasa-PCU se redujo significativamente su

toxicidad en *S. subspicatus* y *D. magna*, siendo ésta reducción mayor que la obtenida cuando la oxidación se llevó a cabo con lacasa-HBT. Puesto que se ha comprobado que la transformación del PAH tras 72 h es total en ambos sistemas enzimáticos, y que el mecanismo de oxidación utilizado por ambos es el mismo (ver apartado 5.1.3.1), esta diferencia de toxicidad podría deberse a la presencia de especies químicas del mediador artificial. A pesar de no eliminar totalmente la toxicidad, las quinonas acumuladas en el medio de reacción fueron menos tóxicas que el PAH de partida como ya se había descrito para quinonas y otros derivados hidroxilados de benzo[a]pireno, antraceno y fluoranteno en crustáceos y algas (Sepic *et al.*, 2003; Lampi *et al.*, 2006; Pagnout *et al.*, 2006).

5.1.2.2. Oxidación de colorantes

Ácidos *p*-hidroxicinámicos como mediadores. La lacasa de *P. cinnabarinus* fue capaz de oxidar eficazmente los colorantes *Acid Blue 74* y *Reactive Blue 19*, en menor cantidad *Aniline Blue*, y muy ligeramente *Reactive Blue 38*, de tipo indigo, antraquinona, triarilmetano y ftalocianina, respectivamente. Estos resultados corroboran los datos publicados con anterioridad para los tres primeros colorantes con las lacasas de *Myceliophthora thermophila*, *Polyborus pinisitus*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa* y *Trametes hirsuta* (Abadulla *et al.*, 2000; Claus *et al.*, 2002; Camarero *et al.*, 2005). Mientras que el mediador artificial HBT no promueve significativamente la degradación de estos colorantes (Claus *et al.*, 2002), se ha descrito la capacidad de ciertos compuestos fenólicos de origen natural como la acetosiringona o vainillina para promover notablemente la decoloración de tintes orgánicos por lacasa (Camarero *et al.*, 2005). Del mismo modo, los ácidos *p*-hidroxicinámicos empleados en este trabajo actuaron como mediadores de lacasa, incrementando los porcentajes de decoloración de los colorantes oxidados por la enzima, y posibilitando la oxidación de aquéllos que la enzima, en ausencia de mediador, no puede oxidar.

En el curso de estos estudios se ha conseguido decolorar dos colorantes muy recalcitrantes a la degradación: *Reactive Black 5* y *Azure B*. El *Reactive Black 5*, de tipo diazo, no es oxidado por la lacasa de *P. cinnabarinus* en ausencia de mediador del mismo modo que tampoco lo es por las lacasas de *M. thermophila*, *P. pinisitus* y *T. versicolor* (Claus *et al.*, 2002; Camarero *et al.*, 2005), debido a su elevado potencial redox (1,3 V) (Zille *et al.*, 2004). Por este motivo fue utilizado como sustrato en un *screening* previo de compuestos

mediadores de lacasa (Camarero *et al.*, 2005). Este colorante tampoco es degradado por oxidantes químicos como el Mn^{3+} (Heinfling *et al.*, 1998). Sin embargo, en presencia de ácido sinápico como mediador se consiguió hasta un 95% de decoloración de *Reactive Black 5* (con la mayor concentración de mediador ensayada). El *Azure B* ha sido utilizado para la detección de lignina peroxidasa en hongos, ya que ni la lacasa ni la manganoso peroxidasa pueden oxidarlo (Archibald, 1992). Aunque no fue oxidado por la lacasa sola, la presencia de ácido *p*-cumárico permitió la oxidación de este colorante (alcanzando hasta un 60% de decoloración). El mayor potencial redox de este ácido con relación a sus análogos (ferúlico y sinápico) podría explicar los diferentes resultados obtenidos (Lin *et al.*, 1998).

Por otro lado, la concentración del mediador juega un papel importante en la reacción. En este trabajo se ha demostrado la eficacia de los ácidos *p*-hidroxicinámicos para actuar como mediadores de lacasa utilizando relaciones de mediador/sustrato de 1 a 10, inferiores a las utilizadas en otros estudios de decoloración con mediadores artificiales en los que utilizan entre 30 y 50 veces más de los mediadores artificiales HBT o ácido violúrico que de colorante (Kokol *et al.*, 2007).

Toxicidad. La degradación de diferentes tipos de colorantes por lacasa, o lacasa-mediador, implicaría no sólo la eliminación del color, sino también la reducción de su toxicidad (Abadulla *et al.*, 2000). En el caso de los colorantes de tipo azo que son los más utilizados en la industria textil y por tanto los que están presentes en mayor cantidad en sus efluentes, el tratamiento con lacasa produce la ruptura asimétrica del enlace azo, liberando nitrógeno molecular y generando un radical sulfofenilo que es estabilizado en forma de 4-sulfofenilhidroperóxido, consiguiendo así la detoxificación del colorante (Chivukula *et al.*, 1995). Por el contrario, la reducción del enlace azo por bacterias conlleva la producción y acumulación de aminas aromáticas incoloras, algunas de ellas muy tóxicas, que no pueden ser degradadas anaeróbicamente (O'Neill *et al.*, 2000). Por otro lado, la degradación de colorantes de tipo indigo como el *Acid Blue 74* por lacasas, genera isatín que es posteriormente transformado hidrolíticamente a ácido antranílico, eliminando así su toxicidad (Campos *et al.*, 2001). En este sentido se ha corroborado el descenso de toxicidad de las muestras de *Acid Blue 74* decoloradas con lacasa-mediador natural (lacasa-PCU) mediante Microtox®.

Ácido sinápico. El ácido sinápico, el mejor sustrato de la lacasa de *P. cinnabarinus* entre los compuestos ensayados, fue el mediador más rápido y eficaz en la oxidación de colorantes. Otros dos derivados dimetoxilados, acetosiringona y siringaldehído, también buenos sustratos de la enzima, resultaron ser eficaces promotores de la decoloración de tintes (Camarero *et al.*, 2005). La presencia de los dos grupos donadores de electrones en posición *orto* con respecto al grupo fenol favorece su rápida oxidación por la enzima (Marzullo *et al.*, 1995). La fuerte capacidad mediadora de estos compuestos se debe a: a) su rápida oxidación por la enzima, lo que genera una alta concentración de radicales libres; y b) la estabilidad/reactividad de estos radicales fenoxilo. Los dos sustituyentes metoxilo incrementan el tiempo de vida de los radicales fenoxilo de los derivados dimetoxilados al prevenir reacciones de acoplamiento 5-5', entre otras. Por otro lado, en el caso concreto del ácido sinápico, hay que tener en cuenta además la fuerte tendencia al acoplamiento β - β' de sus radicales fenoxilo (Lacki *et al.*, 1998). Los dímeros fenólicos generados, una vez oxidados por la enzima, darían lugar a nuevos radicales fenoxilo estables, ya que no podrían sufrir nuevas reacciones de acoplamiento. La implicación de estos dímeros fenólicos en la oxidación de colorantes por lacasa y ácido sinápico, se comenta en el apartado 5.1.3.3.

Ácido ferúlico. El ácido ferúlico, actuó como eficaz mediador en la decoloración de *Azure B*, que no es oxidado por la enzima en ausencia de mediador, y del *Acid Blue 74*, que sí es oxidado por la enzima. En ambos casos, los porcentajes de decoloración finales fueron dependientes de la concentración de ácido ferúlico empleada. Sin embargo, la presencia de ácido ferúlico inhibió la decoloración del resto de colorantes que la enzima puede oxidar por sí sola. El aumento de la concentración de ácido ferúlico disminuyó el porcentaje de decoloración de *Aniline Blue* obtenido, lo que sugiere un fenómeno de inhibición competitiva por el sustrato. Los niveles de decoloración obtenidos por lacasa y ácido ferúlico oxidado durante diferentes tiempos fueron en todos los casos, menores que los obtenidos con lacasa sola, aunque aumentaron a medida que se incrementó el tiempo de oxidación de ácido ferúlico por la enzima. Probablemente, la concentración de ácido ferúlico descienda durante la incubación con la enzima debido a la formación de dímeros de tipo dihidrobenzofurano β - β' y β -5', reduciendo su efecto inhibitorio (Masuda *et al.*, 2006).

Concentraciones crecientes de ácido ferúlico no disminuyeron el porcentaje de decoloración de *Reactive Blue 19* alcanzado, lo que indica que, pese a existir inhibición competitiva por el sustrato: a) la enzima tiene mayor afinidad por el colorante (hecho que no pudimos comprobar al no poder calcular la K_m) y b) que los radicales de ferúlico una vez formados pueden oxidar el colorante en cierta medida. En el caso de *Aniline Blue* y *Reactive Blue 38*, la enzima tendría más afinidad por el ácido ferúlico ya que la decoloración disminuyó a medida que aumentó la concentración del compuesto fenólico.

El ácido sinápico resultó ser un mediador muy eficaz en la decoloración de la práctica totalidad de los colorantes ensayados, sin embargo, tuvo un efecto negativo en la degradación de PAHs por lacasa. El ácido ferúlico, por el contrario, sí actuó como mediador en la oxidación de PAHs, y sin embargo inhibió algunas de las reacciones de decoloración de ciertos colorantes por lacasa. La degradación de 2,4-diclorofenol por lacasa también fue inhibida por ácido ferúlico, aunque mediada por ácido sinápico (Itoh *et al.*, 2000). La viabilidad del sistema lacasa-mediador depende, entre otras cosas, del balance entre la estabilidad y la reactividad del radical de mediador formado, de la reversibilidad de la reacción del mediador oxidado con el sustrato, de la especificidad de los radicales hacia diferentes enlaces o grupos funcionales que va a determinar la afinidad por el sustrato diana, en función de su estructura química, así como de la diferencia de potencial redox o energías de disociación de enlace entre el sustrato y el mediador. El conjunto de estos factores explicaría los diferentes porcentajes de degradación encontrados dependiendo del tipo de sustrato y mediador ensayado.

5.1.2.3. Peroxidación de lípidos

El ácido sinápico, y sobre todo, el ácido *p*-cumárico, tras su oxidación por la enzima, fueron capaces de peroxidar lípidos insaturados, corroborando lo descrito anteriormente para otros fenoles (Srebotnik *et al.*, 2005). Es más, los niveles de TBARS obtenidos a partir de ácido linoléico y Tween 80 con el sistema lacasa-PCU fueron similares o incluso mayores que los obtenidos con lacasa-HBT. La peroxidación se produce por la sustracción de un átomo de hidrógeno por el radical fenoxilo y no por la lacasa (Figura 5.1), como se ha demostrado por la ausencia de TBARS en las reacciones con lacasa sin mediador.

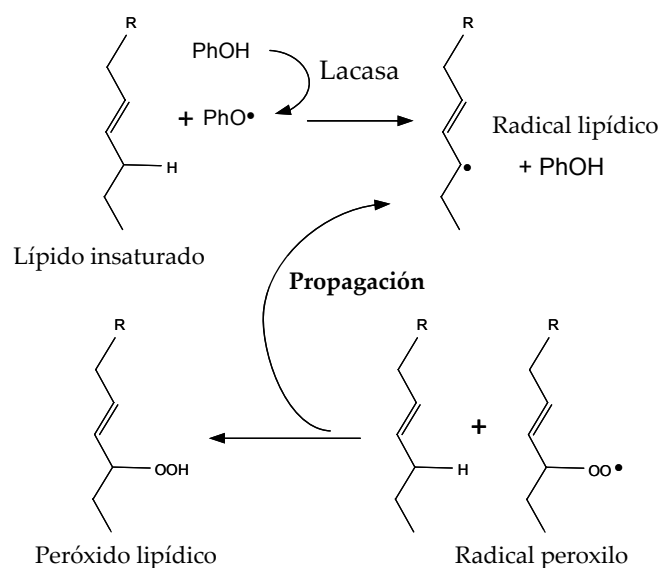


Figura 5.1. Esquema de la peroxidación de lípidos insaturados por los radicales fenoxilo (PhO^\bullet) del ácido *p*-cumárico, generados tras su oxidación con lacasa.

En ausencia de lacasa, estos compuestos fenólicos (forma reducida) actúan como antioxidantes, “secuestrando” los radicales existentes en el medio. Sin embargo, una vez oxidados por lacasa (radical fenoxilo) son capaces de oxidar lípidos insaturados generando radicales peroxilo, en una reacción que la lacasa por sí sola no puede llevar a cabo. Se ha descrito que la adición al medio de reacción de un antioxidante potente como el BHT (hidroxitolueno butilado), inhibe la reacción de peroxidación (Moen *et al.*, 1994; Bao *et al.*, 1994). En el caso de los ácidos *p*-hidroxicinámicos, que actúan a la vez como mediadores de lacasa en reacciones de peroxidación y como potentes antioxidantes, se podría pensar que la peroxidación estaría inhibida, en parte, por dicha capacidad antioxidante, y a pesar de ello, se ha demostrado aquí que el ácido *p*-cumárico produce TBARS en mayor cantidad que el HBT, poseyendo este compuesto una capacidad antioxidante nula.

5.1.3. MECANISMOS DE OXIDACIÓN UTILIZADOS POR LACASA Y ÁCIDOS *p*-HIDROXICINÁMICOS COMO MEDIADORES

5.1.3.1. Vía de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) *versus* vía de transferencia de un electrón (ET)

El análisis de los diferentes productos de reacción obtenidos por los sistemas lacasa-PCU y lacasa-HBT *vs* lacasa-ABTS durante la oxidación de PAHs sugirió la similitud del mecanismo de oxidación empleado por el sistema lacasa-PCU con el utilizado por el sistema lacasa-HBT. Las reacciones mediadas por ABTS se producen a través de una vía de transferencia de electrones (ET), mientras que los radicales nitroxilo de HBT, oxidan el sustrato aromático vía transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) (Cantarella *et al.*, 2003). En este caso, la diferencia entre las energías de disociación de los enlaces rotos (C-H en los PAHs) y formados (RO-H en el mediador) es la fuerza que dirige este mecanismo. La sustracción de un electrón del anillo del benzo[a]pireno por los radicales ABTS^{•+} del mediador oxidado, da lugar a la formación del radical catiónico de dicho PAH. Éste sufre el ataque nucleofílico de los aniones acetato presentes en el medio (Chen *et al.*, 2000), dando lugar al intermediario 6-benzo[a]pirenil acetato (Figura 5.2). La ausencia del intermediario benzo[a]pirenil acetato sustenta la formación de radicales libres, vía HAT, por la lacasa en presencia de ácido *p*-cumárico (o HBT) como mediador. La utilización de la vía HAT por un compuesto fenólico (rojo fenol) como mediador de lacasa en la oxidación de compuestos modelos de lignina había sido descrita con anterioridad (d'Acunzo *et al.*, 2003). Además, la energía de disociación del enlace O-H del ácido *p*-cumárico es superior a la del ácido sinápico (Vafiadis *et al.*, 2003), por lo que su radical fenoxilo tendría mayor capacidad de romper el enlace C-H en el PAH, necesario para llevar a cabo su oxidación. Por otro lado, los niveles de oxidación de antraceno, benzo[a]pireno y pireno por lacasa-PCU no guardan relación con sus potenciales redox (Majcherczyk *et al.*, 1999), sugiriendo que la reacción no está dirigida por la diferencia de potenciales redox entre el mediador oxidado y el sustrato diana como ocurre en la vía de transferencia electrónica.

La peroxidación de lípidos por lacasa y ácido *p*-cumárico, u otros fenoles (Srebotnik *et al.*, 2005), apoya el mecanismo de oxidación de PAHs con lacasa-PCU a través de una vía de transferencia de un átomo de hidrógeno

(HAT) que genera radicales libres. Además, la ausencia de TBARS con el sistema lacasa-ABTS corrobora el mecanismo de transferencia de electrones.

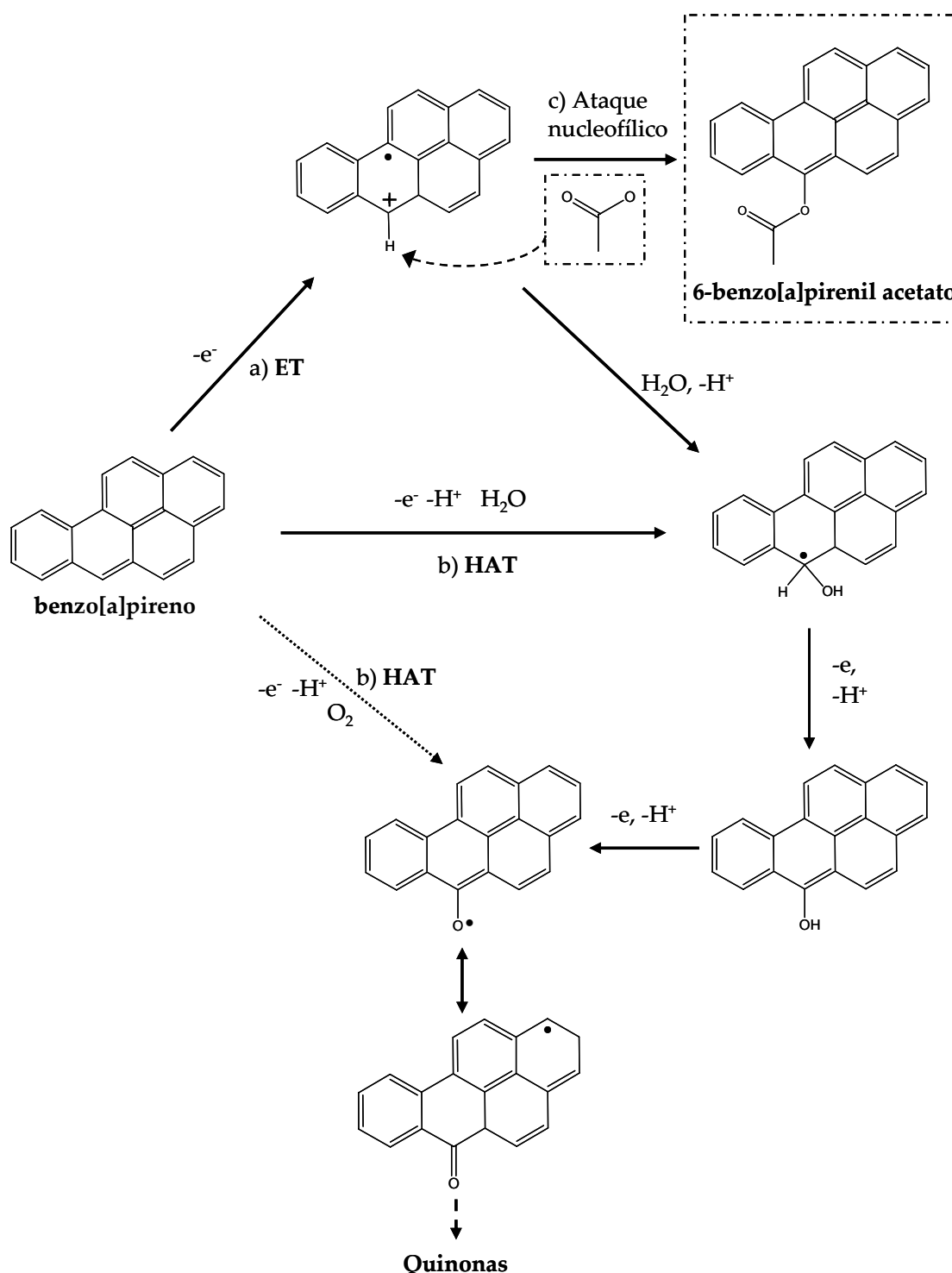


Figura 5.2. Rutas de oxidación de benzo[a]pireno por: a) el sistema lacasa-ABTS vía transferencia electrónica (ET) o b) los sistemas lacasa-PCU y lacasa-HBT vía transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT). c) Ataque nucleofílico de los iones acetato presentes en la mezcla de reacción.

5.1.3.2. Productos del acoplamiento oxidativo de radicales fenoxilo como mediadores de lacasa

La formación de especies químicas sucesivas durante la oxidación de los ácidos *p*-hidrocinámicos por lacasa se demuestra por los cambios producidos en el espectro de absorción del ácido sinápico (Figura 5.3).

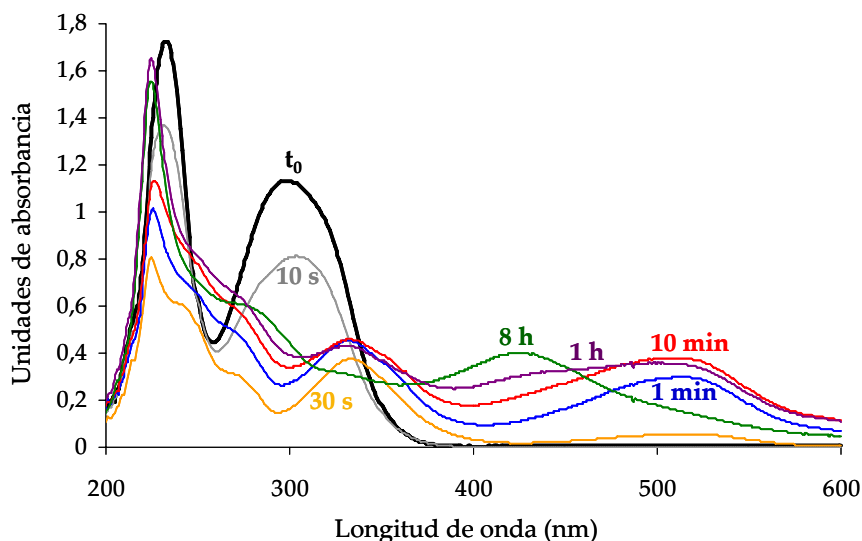


Figura 5.3. Cambios en el espectro UV-visible del ácido sinápico (50 μ M) durante su oxidación por lacasa. Los diferentes espectros corresponden a tiempo 0 (línea negra con máximo de absorbancia a 300 nm), 10 seg (línea gris), 30 seg (línea amarilla, con máximo de absorbancia a 335 nm), 1 min (línea azul, con máximo de absorbancia a 335 y 515 nm), 10 min (línea roja), 1 h (línea morada, se traslada el máximo de absorbancia de 515 a 425 nm) y 8 h (línea verde, con máximo de absorbancia a 425 nm).

Los radicales fenoxilo serían la primera especie formada, seguidos por el acoplamiento β - β' de las formas resonantes produciendo un dímero de ácido dihidrosinápico. La lactonización de la cadena lateral restauraría los grupos fenólicos formando la dilactona del ácido dehidrosinápico (3,6-bis-(4-hidroxi-3,5-dimetosi-fenil)-tetrahidro-furo [3,4-c]furan-1,4-diona) (Figura 5.4) (Lacki *et al.*, 1998; Tranchimand *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007).

Esta dilactona es también sustrato de lacasa y produce un radical fenoxilo estable, ya que no son posibles reacciones de acoplamiento adicionales. La fácil oxidación de estas lactonas está en concordancia con su fuerte actividad antioxidante (Liu *et al.*, 2007). Estos productos diméricos fenólicos actuarían como mediadores de lacasa, de acuerdo con lo que se ha demostrado en este trabajo con el siringaresinol, un dímero fenólico homólogo, cuya presencia promovió la oxidación de colorantes orgánicos

por lacasa, permitiendo la decoloración de *Reactive Black 5*, con eficiencias similares a las del ácido sinápico.

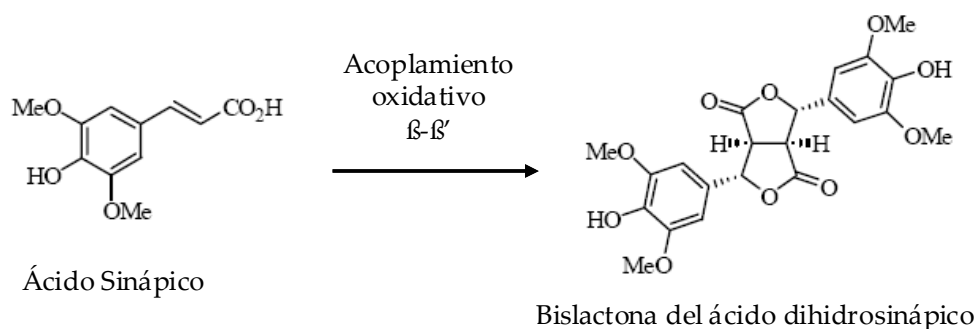


Figura 5.4. Reacción de acoplamiento oxidativo del ácido sinápico.

Al cabo de 1 h de reacción (en las condiciones ensayadas) el máximo de absorbancia a 512 nm se traslada a 425 nm, en concordancia con la ruptura no enzimática de los productos diméricos, dando lugar a *p*-benzoquinona como un producto final de la oxidación de ácido sinápico por lacasa (Lacki *et al.*, 1998).

Si bien la formación de este tipo de dímeros no queda descartada durante la oxidación de ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico por lacasa, no está tan favorecida. Se producen un amplio rango de productos de condensación, debido a la formación de uniones 5-5', β-5' y 4-O-5' que no se producen durante la oxidación de ácido sinápico (Arrieta-Baez *et al.*, 2006).

5.1.3.3. Cinéticas de oxidación de ABTS por lacasa y ácidos *p*-hidroxicinámicos

El ABTS se utilizó como sustrato de lacasa para estudiar la capacidad de los radicales de los ácidos *p*-hidroxicinámicos para actuar como mediadores de lacasa. El ABTS reducido se obtuvo añadiendo el ácido *p*-hidroxicinámico al radical ABTS^{•+} generado enzimáticamente. Tras su inmediata reducción, el ABTS comenzó a re-oxidarse como consecuencia del sistema lacasa-mediador (Figura 5.5).

El radical ABTS^{•+} fue totalmente reducido de forma instantánea al añadir ácido sinápico a la mezcla de reacción. A pesar de que el ácido sinápico fue totalmente oxidado debido a la cantidad equimolecular añadida, se produjo a continuación la re-oxidación del ABTS (más lentamente) sugiriendo que estaban teniendo lugar reacciones adicionales, probablemente la formación de los dímeros fenólicos (lactonas) mencionados en el apartado anterior,

que actuarían a su vez como mediadores de la enzima. Finalmente, ambos, ABTS y ácido sinápico fueron totalmente oxidados.



Figura 5.5. Esquema de oxidación-reducción de ABTS.

La re-oxidación del ABTS se produjo a través del sistema lacasa mediador y no por la lacasa sola, ya que se observaron diferentes niveles de oxidación en presencia de cada uno de los ácidos *p*-hidroxicinámicos. La más rápida oxidación de ácido sinápico y ferúlico por la lacasa de *P. cinnabarinus* está en concordancia con los bajos valores de K_m y altos valores de k_{cat} de la enzima por estos compuestos frente al ABTS. La afinidad por los dímeros fenólicos estaría en el mismo orden, de acuerdo con los resultados obtenidos con el siringaresinol.

Las diferencias en la naturaleza y producción de las especies de oxidación de los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos afectarían al rendimiento y rapidez del sistema lacasa-mediador. La rápida oxidación del ácido sinápico por la enzima resulta en una alta concentración de radicales fenoxilo y la rápida formación de dilactonas fenólicas que actúan a su vez como mediadores. Sin embargo, el ácido *p*-cumárico es mucho más lentamente oxidado por la lacasa y sus radicales fenoxilo podrían formar una amplia variedad de dímeros y oligómeros con bajo contenido fenólico debido a la formación de uniones 4-O-5' y estructuras de tipo fenilcumarano (Lacki *et al.*, 1998; Tranchimand *et al.*, 2006; Daquino *et al.*, 2006).

Los valores TEAC obtenidos en etanol están relacionados con los potenciales redox de los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos, sugiriendo una ruta de transferencia de electrones entre estos fenoles y los radicales de ABTS•+ y de acuerdo con la fuerte capacidad de unir un hidrógeno del solvente, donde la ruta de transferencia de un átomo de hidrógeno es más difícil (Foti *et al.*, 2004). Por el contrario, en medio acuoso (donde los valores TEAC para los tres ácidos son similares), la conducta antioxidante de las formas

monoaniónicas (COO^-/OH) sería determinada por su habilidad para donar un átomo de hidrógeno a los radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

5.1.3.4. Peroxidación de lípidos como vía extra para la oxidación de PAHs recalcitrantes

El mayor potencial redox de fenantreno (1,50 V) comparado con el de antraceno (1,09 V) y el de benzo[a]pireno (1,27 V) (Pysh *et al.*, 1963) explica la incapacidad de la lacasa de oxidar este PAH. El uso de mediadores (naturales o artificiales) promovió la degradación de antraceno y benzo[a]pireno, pero no la de fenantreno. Por este motivo, en el presente trabajo se planteó estudiar la degradación de fenantreno por la vía de la peroxidación de lípidos con lacasa y mediadores fenólicos naturales, frente al uso de HBT (Bohmer *et al.*, 1998).

En presencia de Tween 80 como fuente de ácidos grasos insaturados, la lacasa y el ácido *p*-cumárico transformaron eficientemente este PAH, gracias a la formación de radicales peroxilo de lípidos, que actuarían como fuertes oxidantes. La participación de dichos radicales se demostró porque el fenantreno es oxidado por el sistema lacasa-mediador natural sólo cuando hay ácidos grasos insaturados en el medio. Sin embargo, no se consiguió degradar el fenantreno con lacasa-ABTS en presencia de Tween 80 (datos no mostrados), en concordancia con la ausencia de TBARS en los ensayos de peroxidación de lípidos llevados a cabo con este sistema, y con resultados publicados anteriormente (Srebotnik *et al.*, 2005). El mecanismo de oxidación (ET) utilizado por los radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$, en contraposición con la vía HAT de los radicales nitroxilo del HBT (Cantarella *et al.*, 2003) o fenoxilo del ácido *p*-cumárico (según se ha podido comprobar en este trabajo), explican estos resultados.

La oxidación de fenantreno genera 9,10-fenantrenquinona como intermediario del ácido 2,2-difénico que se produce por la ruptura del anillo (Daniel *et al.*, 1989; Hammel *et al.*, 1992; Bogan *et al.*, 1996). Pese a que en estos estudios no se pudieron identificar estos productos de oxidación, los peróxidos lipídicos parecen contribuir de forma notable a la degradación de contaminantes aromáticos por las oxidorreductasas ligninolíticas (Reed, 1987; Moen *et al.*, 1994; Bogan *et al.*, 1996), de hecho, su implicación en la mineralización de benzo[a]pireno por el sistema $\text{MnP}/\text{Mn}^{3+}$ de hongos saprófitos del suelo parece un factor clave (Steffen *et al.*, 2003).

5.1.4. PAPEL DE LA LACASA Y LOS MEDIADORES NATURALES EN LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS RECALCITRANTES

Las lacasas son enzimas ampliamente distribuidas en hongos y bacterias del suelo, siendo los mayores productores de lacasa los hongos de podredumbre blanca de la madera. Su expresión está inducida por compuestos fenólicos relacionados con la lignina (Herpoël *et al.*, 2000; Terrón *et al.*, 2004). Estos compuestos fenólicos, originados de la materia en descomposición (Kuiters *et al.*, 1987) e incorporados al humus, están también presentes en forma libre en el suelo (Felbeck, 1971) y son utilizados como bioindicadores del proceso de *turnover* del humus (Djurdjevic *et al.*, 2006). En concreto, el ácido *p*-cumárico (y el ácido ferúlico) son abundantes en la materia vegetal y en suelos de bosques (Suominen *et al.*, 2003) y praderas (Fan *et al.*, 2002), estando también presentes en exudados de las raíces de los árboles (Munzenberger *et al.*, 1997).

La descripción de estos mediadores naturales fenólicos apoya el papel de las lacasas en el proceso de biodegradación de lignina dada la ubicuidad de estos compuestos y de los hongos productores de lacasa. La implicación de las lacasas y los mediadores naturales, generados durante el proceso de degradación del polímero de lignina, sería especialmente relevante en aquellos hongos que producen lacasa como principal oxidorreductasa ligninolítica.

Así mismo el éxito de la transformación *in vitro* de PAHs y colorantes por las diferentes vías de actuación de la lacasa y los mediadores naturales demostradas en este trabajo, o para detoxificar pesticidas organofosforados (Amitai *et al.*, 1998) o clorofenoles (Ullah *et al.*, 2000), manifiesta el papel potencial de estos sistemas en procesos de biorremediación *in vivo* en suelos contaminados o su posible utilización en procesos de descontaminación de efluentes industriales (Figura 5.6). El potencial oxidativo de los sistemas lacasa-mediador natural se ve extendido por el mecanismo de peroxidación lipídica, apoyado en la existencia de ácidos grasos insaturados en las hifas del micelio de hongos (Lestan *et al.*, 1990), dónde se podrían iniciar los procesos de peroxidación, que facilitarían la oxidación de compuestos recalcitrantes.

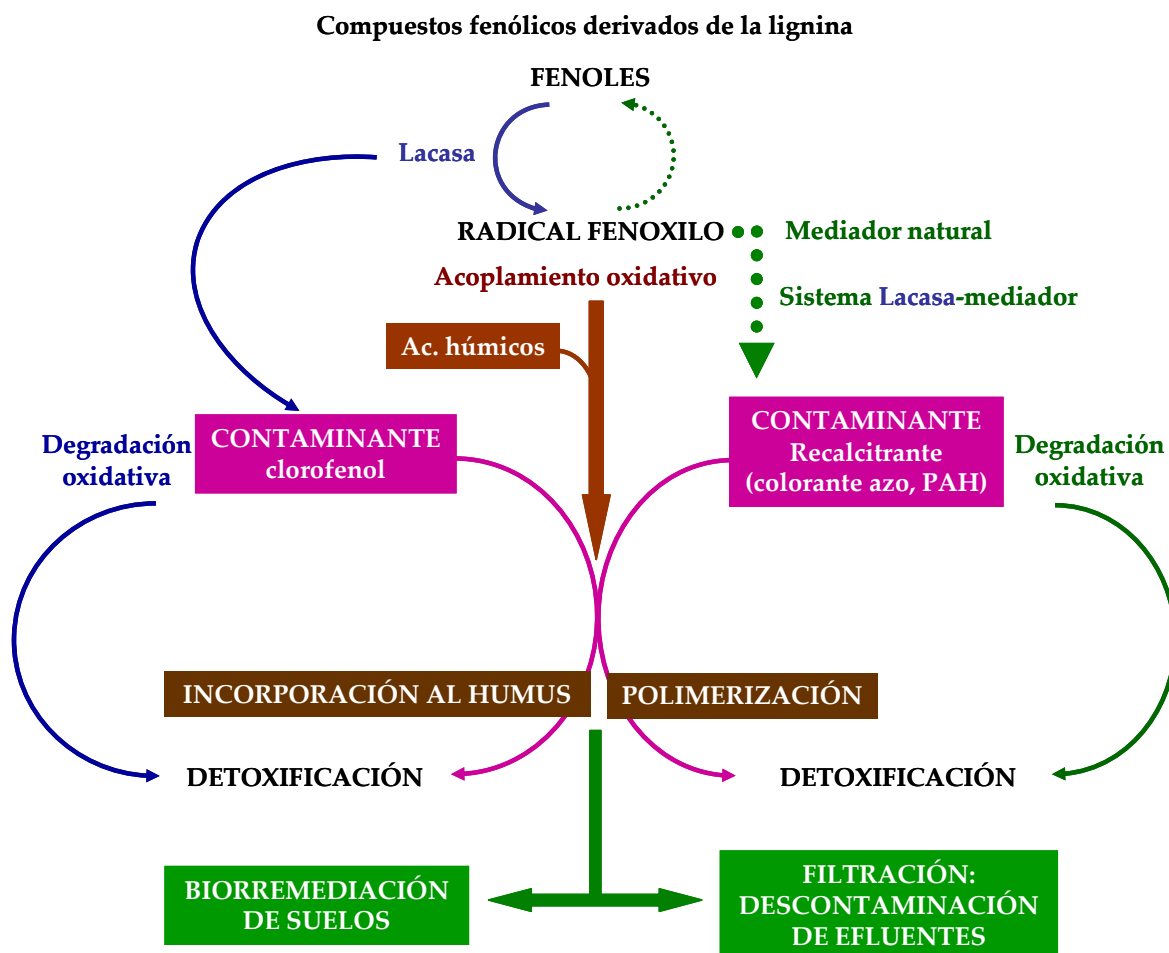


Figura 5.6. Posible papel del sistema lacasa-mediador natural en procesos de biorremediación de suelos y descontaminación de efluentes industriales.

Las lacasas pueden catalizar el acoplamiento oxidativo de fenoles dando lugar a su polimerización. Esta capacidad de las lacasas puede ser utilizada para la detoxificación de efluentes contaminados con clorofenoles u otros compuestos fenólicos mediante su acoplamiento en polímeros que pueden ser retirados por filtración. Otra aplicación basada en su capacidad polimerizadora es la biorremediación de suelos contaminados mediante la inmovilización de los contaminantes en las sustancias húmicas del suelo, reduciendo su biodisponibilidad (Bollag *et al.*, 1980; Tatsumi *et al.*, 1992; Dawel *et al.*, 1997; Dec *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2002). Por otra parte, la oxidación de contaminantes halogenados (por ejemplo clorofenoles) por lacasa conlleva su deshalogenación y por tanto, la reducción de su toxicidad (Bollag *et al.*, 2003). Además, tal y cómo se ha demostrado en este trabajo, las lacasas en presencia de fenoles naturales como mediadores redox, son capaces de transformar contaminantes más recalcitrantes, inaccesibles hasta

entonces para la lacasa, como colorantes azo de alto potencial redox como el *Reactive Black 5* o PAHs como el benzo[a]pireno, que son además, detoxificados por la acción de estos sistemas enzimáticos o que pueden sufrir reacciones de acoplamiento, quedando inmovilizados en el suelo.

La descripción de estos mediadores naturales de lacasa, respetuosos con el medioambiente y disponibles a bajo coste, puede suponer un significativo avance hacia la implementación industrial del sistema lacasa-mediador para el desarrollo de nuevos procesos de biotecnología blanca más limpios y eficientes. Los nuevos sistemas lacasa-mediador natural podrían ser integrados en diferentes etapas del proceso de fabricación de papel, desde la degradación de la lignina residual responsable del color de las pastas de papel en las secuencias de blanqueo (Camarero *et al.*, 2004; Camarero *et al.*, 2007), pasando por la eliminación de los lípidos responsables de los depósitos de *pitch* (que reducen la calidad de las pastas y se acumulan en los circuitos) (Gutiérrez *et al.*, 2007) hasta el final del proceso, en el tratamiento de los efluentes de blanqueo. Esto permitiría la reutilización de las aguas ya que no se generarían organoclorados y no habría *pitch* en los circuitos, lo que supondría un importante avance hacia el lanzamiento de las biorefinerías de residuos cero. De gran relevancia es el hecho de que estos mediadores fenólicos pueden ser obtenidos de las propias aguas del proceso de fabricación de la pasta de papel, por ejemplo, las lejías negras procedentes de la cocción de pasta kraft de eucalipto poseen cantidades notables de algunos de estos compuestos fenólicos (Camarero *et al.*, 2007).

5.2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LACASAS DE ALTO POTENCIAL REDOX

5.2.1. EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA LACASA DE *P. cinnabarinus* EN *S. cerevisiae*

Para acometer la mejora de la lacasa de *P. cinnabarinus* por evolución dirigida se requiere, en primer lugar, de su expresión funcional en *S. cerevisiae*, hospedador heterólogo utilizado en estos ensayos; y, en segundo lugar, de niveles suficientes de lacasa activa en microcultivos para ser detectados en los ensayos sistemáticos colorimétricos (*high-throughput screening*). La expresión de lacasas de basidiomicetos en *S. cerevisiae* es dificultosa y ofrece rendimientos muy bajos (Kunamneni *et al.*, 2008). Para solventar estas dificultades y conseguir ambos fines, se reemplazó la secuencia del péptido señal de la lacasa nativa, por la secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae*, se optimizaron las condiciones de expresión de la lacasa por la levadura y se ajustaron las condiciones del ensayo sistemático de actividad.

5.2.1.1. Construcción de α -PcL

El planteamiento de la construcción α -PcL surgió en base a estudios previos donde se había utilizado con éxito la secuencia señal del factor α para la expresión de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*. La fusión entre la enzima a expresar heterológamente y la secuencia señal del factor α es un sistema de expresión en levaduras aplicable a un amplio rango de proteínas activas con tamaños que van desde 24 hasta 842 aminoácidos. Desde los primeros trabajos en los que se utilizó esta solución para la secreción de proteínas heterólogas (Bitter *et al.*, 1984; Brake *et al.*, 1984), muchas otras proteínas han sido expresadas utilizando este sistema (Miyajima *et al.*, 1985; Ernst, 1986; Barr *et al.*, 1987; Jonsson *et al.*, 1997; Bulter *et al.*, 2003b; Abdelmoula-Souissi *et al.*, 2007). En nuestro caso, esta construcción permitió expresar de forma activa la lacasa de *P. cinnabarinus* en *S. cerevisiae* con unos niveles suficientes para iniciar los estudios de evolución dirigida objeto del presente trabajo.

En la construcción se incluyó la secuencia señal completa del factor α , es decir las secuencias del prepéptido y del propéptido, ya que ambos juegan un papel crucial en la secreción de la proteína. El prepéptido, interviene en la inserción de la cadena polipeptídica en maduración en el retículo

endoplasmático, y el propéptido, en el plegamiento de la cadena polipeptídica durante su transición y estancia en el aparato de Golgi (Brake *et al.*, 1984). Además, posee tres sitios de N-glicosilación capaces de unirse a receptores de carbohidratos que facilitan el movimiento de las glicoproteínas desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi, disminuyendo el tiempo de tránsito intracelular de la proteína y favoreciendo así su secreción (Shuster, 1991).

5.2.1.2. Optimización de las condiciones de inducción de lacasa

El reemplazo de la secuencia señal de la lacasa nativa por la del pre-propéptido del factor α posibilitó la secreción de PcL por la levadura. Sin embargo, los niveles de enzima fueron muy bajos. Por este motivo, y con el fin de alcanzar niveles detectables y reproducibles de actividad lacasa en el medio de cultivo, se optimizaron las condiciones de expresión/secreción de lacasa en microcultivos de *S. cerevisiae*.

El efecto positivo de la adición de etanol al medio de expresión en el crecimiento de *S. cerevisiae*, pudiera deberse a su empleo como fuente de carbono adicional por la levadura (van de Laar *et al.*, 2007). Otros autores, sin embargo han descrito la inhibición del crecimiento de levaduras con el incremento de la concentración de etanol (Alfenore *et al.*, 2004) debido a cambios en la fisiología y en el balance redox del medio (Cortassa *et al.*, 1995). Del mismo modo, la adición de etanol favoreció la producción de lacasa detectada en los cultivos de *S. cerevisiae*, coincidiendo con lo descrito anteriormente para cultivos de *P. cinnabarinus* y de otras hongos de podredumbre blanca productores de lacasa (Lee *et al.*, 1999; Lomascolo *et al.*, 2003). El etanol solubiliza los lípidos que forman la membrana plasmática, por lo que incrementaría la permeabilidad de ésta y facilitaría la secreción de la enzima. Además, se ha descrito que la adición de etanol genera una respuesta a estrés de la célula pudiendo inducir las proteínas de *shock* térmico, en particular chaperonas citoplasmáticas y del retículo endoplasmático, que también jugarían un papel importante en el proceso de secreción (van de Laar *et al.*, 2007) y en la permeabilidad de las membranas (Petrov *et al.*, 1990). Por otro lado, el cambio en el balance redox en el retículo endoplasmático también podría favorecer el correcto empaquetamiento de estas proteínas. Por otro lado, en estudios de expresión homóloga de lacasa en *P. cinnabarinus* utilizando diferentes promotores, se ha comprobado que la presencia de etanol aumenta

significativamente la expresión de la lacasa por el hongo. Esta inducción de la expresión se explicaría por la presencia de elementos de respuesta a estrés en dichos promotores, elementos que parecen existir incluso en promotores constitutivos en vista de los resultados obtenidos (Alves *et al.*, 2004).

Por otro lado, la concentración de etanol ensayada no pareció afectar ni a la actividad ni a la estabilidad de la enzima, en concordancia con resultados previos donde concentraciones de etanol de hasta 50 g/L no afectaron a la actividad enzimática (Lee *et al.*, 1999).

La adición de ácido ferúlico o vainillina, conocidos inductores de la producción de lacasa en hongos ligninolíticos como *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1996b; Herpoël *et al.*, 2000; Lomascolo *et al.*, 2003), no tuvo efectos positivos en la producción de lacasa por *S. cerevisiae*. Las diferencias detectadas con ABTS y DMP pueden deberse a interferencias con el método de medida de actividad lacasa (ver siguiente apartado).

Por otro lado, se corroboró que la expresión de lacasa fue altamente dependiente de la concentración de CuSO₄ en el medio de inducción (Palmieri *et al.*, 2000; Hoshida *et al.*, 2005). La concentración de CuSO₄ es uno de los factores más importantes para la producción eficiente de enzimas de cobre, ya que es necesario para el correcto empaquetamiento y ensamblaje de la lacasa en los pasos post-transcripcionales (Hoshida *et al.*, 2005). Sin embargo, el cobre resulta tóxico para la célula en determinadas concentraciones (rango mM), pudiendo además inhibir la actividad lacasa (Robles *et al.*, 2002). En nuestro caso, concentraciones de hasta 4 mM no inhibieron el crecimiento de *S. cerevisiae* en microcultivo, induciendo significativamente la producción de lacasa. El uso de concentraciones de CuSO₄ superiores a 4 mM produjo un descenso de la actividad lacasa (en cultivos en matraz) debido al menor crecimiento obtenido.

Por último, se determinó el efecto positivo del descenso de la temperatura de incubación por debajo de los 30 °C (utilizados habitualmente para el crecimiento de las levaduras) en la expresión heteróloga de la lacasa de *P. cinnabarinus*. Aunque las incubaciones de los microcultivos de *S. cerevisiae* durante el proceso de evolución dirigida se realizaron a 30 °C por motivos técnicos, en la producción de la variante 7A9 a mayor escala se comprobó que la producción de lacasa fue el doble cuando el cultivo se incubó a 20 °C en lugar de a 30 °C. Este hecho ratifica los resultados obtenidos anteriormente para la expresión heteróloga de lacasas fúngicas en *S.*

cerevisiae o *Pichia Pastoris* (Cassland *et al.*, 1999) y de otras oxidorreductasas (Eibes *et al.*, 2009).

5.2.1.3. Ensayo sistemático de actividad

Para la exploración sistemática y detección de actividad lacasa en las diferentes generaciones de clones (*high-throughput screening*) se utilizaron dos métodos colorimétricos diferentes: con ABTS (sustrato de tipo no fenólico) y DMP (fenólico). Con ello se evita que el incremento de actividad lacasa esté dirigido exclusivamente hacia un único sustrato. A lo largo de los tres ciclos evolutivos no se obtuvo ningún clon activo frente a un sustrato e inactivo frente al otro, lo cual pone de manifiesto que las mutaciones acumuladas influyeron en la mejora de la actividad catalítica general de la enzima.

Por otra parte, la detección de actividad lacasa con más de un sustrato resultó muy útil para detectar interferencias del medio de inducción con el método colorimétrico. Así, durante la optimización del medio de expresión, la actividad lacasa con ABTS se vio enmascarada por la presencia de ácido ferúlico y vainillina en el medio. La inhibición competitiva entre el ABTS y el ácido ferúlico o la vainillina (K_m de 18,7, 7,4 y 18,3 μM , respectivamente) parece ser responsable de este hecho. Sin embargo, la afinidad de la enzima por el DMP es mucho mayor (K_m 3,6 μM), por lo que en el ensayo colorimétrico con DMP no se observaron interferencias de este tipo.

5.2.2. ESTRATEGIA DEL PROCESO EVOLUTIVO

La construcción α -PcL, formada por la secuencia señal del factor α y el ADNc de la lacasa nativa de *P. cinnabarinus*, se sometió al proceso de evolución dirigida, de manera que la acumulación de mutaciones beneficiosas pudiera tener lugar tanto en la secuencia señal como en la secuencia de la lacasa madura. De este modo se pretendía aumentar la actividad lacasa total, que comprende tanto la mejora de la expresión funcional de la enzima en la levadura como la mejora de su actividad catalítica.

La creación de diversidad génica a lo largo del proceso de evolución dirigida se consiguió utilizando dos estrategias diferentes: la mutagénesis inducida del gen en estudio y/o la recombinación de los mutantes resultantes. Se alternaron por tanto metodologías de PCR mutagénica para la introducción de mutaciones puntuales en α -PcL, con procesos de

recombinación *in vivo* de los distintos productos amplificados por PCR en la levadura. De esta manera se facilita la acumulación de las mutaciones beneficiosas y la eliminación de aquéllas que se presentan como deletéreas o neutrales.

Respecto a las técnicas de mutagénesis aleatoria, se ajustó el índice de mutación para introducir de 1 a 3 cambios de aminoácidos por proteína variando la concentración de ADN molde. Con el fin de aumentar la exploración del espacio proteico, se alternó el uso de dos polimerasas que poseen preferencias de mutación diferentes, obteniéndose genotecas heterogéneas con espectros mutacionales distintos. Aunque, tanto la Mutazima II como la Taq polimerasa muestran tendencia hacia las transiciones (sustitución de purinas por purinas ($A \leftrightarrow G$) o pirimidinas por pirimidinas ($T \leftrightarrow C$)), la primera enzima tiende a igualar las mutaciones A y T a las G y C, mientras que la Taq polimerasa (bajo condiciones de PCR propensa a error) es 3 veces más propensa a introducir mutaciones en A o T con relaciones $AT \rightarrow GC/GC \rightarrow AT$ superiores a 1.

En la primera generación se utilizó la polimerasa Mutazima II para generar dos librerías con diferente tasa de mutación (baja y media), conseguidas gracias a la variación de la concentración de ADN molde, manteniendo el resto de parámetros de la reacción constantes. En la genoteca de índice de mutación medio el 20 % de los clones explorados tuvieron menos del 10 % de la actividad del tipo parental. En la genoteca de índice de mutación bajo, el 6 % de los clones explorados tuvieron menos del 10 % de la actividad del tipo parental.

En las dos generaciones siguientes, los genes parentales (mejores mutantes de la generación anterior) se amplificaron y mutagenizaron mediante el uso de Taq/MnCl₂ con el fin de variar el espectro mutacional.

Posteriormente, los productos de PCR se recombinaron *in vivo* en *S. cerevisiae*. Éstos poseen extensiones solapantes de alrededor de 50 pares de bases que facilitan el clonaje *in vivo* y la reparación del vector de expresión mediante un proceso de recombinación homóloga. El método de barajado *in vivo* de ADN se basa en la elevada frecuencia de recombinación homóloga y la fácil manipulación de *S. cerevisiae* (Cherry *et al.*, 1999; Bulter *et al.*, 2003a). La recombinación de los parentales previamente mutagenizados permitió obtener mejores adaptaciones (Bulter *et al.*, 2003b), aumentando la diversidad funcional creada mediante mutagénesis inducida. Con esta

técnica se facilita la combinación de mutaciones beneficiosas, provenientes de los diferentes mutantes seleccionados en cada ciclo evolutivo, promoviendo las mejoras obtenidas por separado como se puede observar en la Figura 5.7.

De los seis clones seleccionados en la segunda generación, tres incorporaron nuevas mutaciones introducidas por PCR mutagénica, y todos acumularon mutaciones procedentes de los diferentes parentales de la primera generación. De la tercera generación, todos los clones seleccionados acumularon cinco mutaciones incorporadas en el primer o segundo ciclo evolutivo. Dos de los clones seleccionados incorporaron nuevas mutaciones debidas al proceso de PCR mutagénica, mientras que los otros dos sólo contuvieron las mutaciones acumuladas en las generaciones anteriores. Estos resultados muestran la idoneidad del diseño de los ensayos de evolución dirigida. Se consiguió la acumulación de las mutaciones beneficiosas generadas en los ciclos anteriores gracias a la recombinación *in vivo* de los genes seleccionados, y además permitió la aparición de nuevas mutaciones favorables.

5.2.3. MUTACIONES INTRODUCIDAS DURANTE EL PROCESO DE EVOLUCIÓN DIRIGIDA

Las mutaciones beneficiosas seleccionadas y acumuladas a lo largo del proceso evolutivo de α -PcL se muestran en la Figura 5.7.

La mutación **A(α 9)D** aparece por primera vez en el mejor mutante de la primera generación (1D12), se conserva en tres de los seis mutantes seleccionados en la segunda generación y en todos los de la tercera generación, gracias a los procesos de recombinación en la levadura llevados a cabo. Esta mutación afecta a un residuo de la región hidrófoba del pre péptido del factor α . Lo que resulta sorprendente ya que la mayor parte de las alteraciones descritas que disminuyen la eficiencia de translocación al retículo endoplasmático de la proteína naciente están relacionadas con la reducción de la hidrofobicidad de esta región, que es el factor más crítico y necesario para la unión a la partícula de reconocimiento de señal (SRP) (Nothwehr *et al.*, 1990). Sin embargo, resultados análogos (sin publicar) se han obtenido durante la evolución en el laboratorio de la lacasa del basidiomiceto PM1, con alta homología de secuencia con la lacasa de *P. cinnabarinus*. Más aún, la mutación de dos residuos hidrófobos por un

residuo polar ácido en la región hidrófoba de la secuencia señal de la invertasa de *Debaryomyces occidentalis*, también ha mejorado la actividad detectada en el medio.

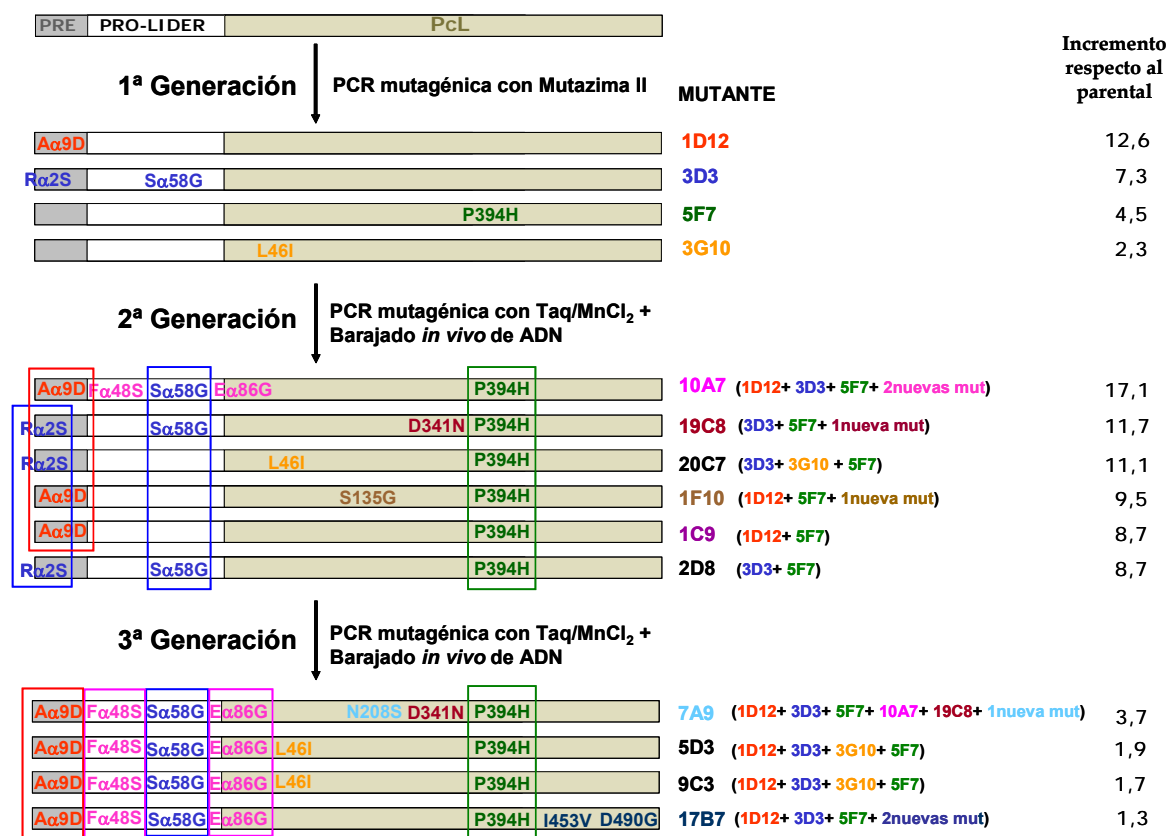


Figura 5.7. Esquema que muestra las mutaciones beneficiosas seleccionadas durante el proceso de evolución de la lacasa de *P. cinnabarinus* (α -PcL). Se resaltan en diferentes colores las mutaciones introducidas en cada ciclo, para apreciar los eventos de entrecruzamiento. Se muestran también los incrementos de actividad total en cada mutante con respecto al mejor mutante de la generación anterior.

La otra mutación localizada en el prepéptido del factor α es **R(α 2)S** y surge en el segundo mejor mutante de la primera generación, 3D3. Esta mutación aparece en tres de los seis mejores mutantes de la segunda generación con la particularidad de que los mutantes que poseen esta mutación no contienen la mutación A(α 9)D. Así, esta mutación no se conservó en ninguno de los clones seleccionados de la tercera generación (todos con la mutación A(α 9)D).

La mutación **S(α 58)G** proviene también del mutante 3D3 de la primera generación. Afecta a uno de los tres sitios de N-glicosilación del propéptido del factor α (Asn-Ser-Thr por Asn-Gly-Thr), implicados en la mejora de secreción de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*. El efecto beneficioso de

esta mutación, que se conserva en varios de los mutantes seleccionados de la segunda generación y en los cuatro mutantes seleccionados de la tercera, estaría relacionado con que la Gly podría aportar flexibilidad a esta región. Ésta permitiría una mayor facilidad de anclaje del carbohidrato a los receptores que facilitaría el movimiento de las glicoproteínas desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi, disminuyendo el tiempo de tránsito intracelular de la proteína y favoreciendo así su secreción (Shuster, 1991; Sagt *et al.*, 2000).

Las mutaciones **F(α 48)S** y **E(α 86)G**, localizadas en el propéptido y en la zona de procesamiento del propéptido del factor α , respectivamente, aparecen por primera vez en el mutante 10A7 de la segunda generación como consecuencia de la PCR mutagénica, y se conservan en todos los mutantes seleccionados de la tercera generación.

Las mutaciones en la secuencia señal del factor α parecen responsables de una mejora en la secreción de la lacasa por la levadura. En concreto, en los dos mejores clones de la primera generación no existen otras mutaciones en la secuencia de la proteína madura que sean responsables del aumento de actividad lacasa en el medio. Análogamente, mutaciones puntuales introducidas en la secuencia señal de la α -galactosidasa empleada para la expresión de una proteína humana en levaduras, permitieron optimizar los niveles de expresión (Hofmann *et al.*, 1991). Las mutaciones que mejoraron la secreción resultaron ser parcialmente específicas para cada proteína y para diferentes cepas de hospedador. Sin embargo, en nuestro caso, existen indicios de que mutaciones en regiones concretas del prepéptido del factor α podrían ser beneficiosas para la expresión heteróloga no sólo de lacasas fúngicas, sino quizás de otras proteínas eucarióticas en levaduras.

Respecto a las mutaciones en la secuencia de la proteína madura, aparecen siete mutaciones beneficiosas a lo largo del proceso de evolución dirigida. La mutación **P394H** surge en la primera generación y se conserva durante las siguientes recombinaciones en todo el proceso evolutivo. Esta mutación es la única responsable de la mejora de actividad de 4,5 veces en el mutante 5F7 de la primera generación. Por este motivo, y por ser la Pro 394 un residuo conservado del centro activo de la enzima, en el entorno del cobre T1, parece responsable de la mejora en la actividad catalítica de la enzima. El residuo adyacente, la His 395 es uno de los residuos que coordinan al cobre T1, junto con la His 456 y la Cys 451. El cambio de Pro 394 por una His promueve la formación de un puente de hidrógeno con la

Asn 208, que se encuentra próxima al ligando de cobre His 395 (Figura 5.8). La formación de este puente de H puede provocar un cambio estructural en el entorno del sitio activo de la enzima, al producir una elongación del enlace del cobre T1 con el nitrógeno δ de la His 395 en el sitio T1. En este sentido, la mayor longitud del enlace entre el cobre T1 y el nitrógeno δ de la otra His que coordina al cobre (His 456) en las lacasas de alto potencial redox de *T. versicolor* y *P. cinnabarinus* con respecto a las lacasas de bajo potencial redox (como la de *M. albomyces*), ha sido apuntado como responsable de la modulación del potencial redox en el sitio de cobre T1 (Piontek *et al.*, 2002).

Otra de las mutaciones localizada en la secuencia de la proteína madura es la mutación **D341N**, que aparece en el segundo ciclo evolutivo y se conserva en el mejor mutante de la tercera generación. La presencia de esta mutación en el mutante 19C8 de la segunda generación permite una mejora de 11,7 veces de actividad total (respecto al parental) frente a los 8,7 del mutante 2D8, del que sólo se diferencia en la mencionada mutación. Esta mutación se encuentra localizada en la superficie de la proteína. La sustitución del Asp 341 por una Asn implica la creación de un nuevo sitio de N-glicosilación (Asn-His-Thr), que podría favorecer la secreción de la proteína, análogamente a lo que ocurre con otras proteínas heterólogas en levaduras (Sagt *et al.*, 2000). Por otro lado, con esta mutación se iguala en esta región la secuencia peptídica de *lac 1* de *P. cinnabarinus* con las otras dos isoenzimas de lacasa que posee este hongo, *lac 3-1* y *lac 3-2*, ya que poseen una Asn en lugar de un Asp en la posición 341 (Eggert *et al.*, 1998; Temp *et al.*, 1999).

La mutación **N208S** es consecuencia de la PCR mutagénica de la tercera generación y aparece en el mejor mutante obtenido en este ciclo. El cambio de la Asn 208 por una Ser, también polar pero de menor tamaño, provocaría la ruptura del puente de hidrógeno existente entre la His 394 y la Asn 208 en las variantes evolucionadas seleccionadas en el segundo ciclo. El motivo ²⁰⁴Ser-Cys-Asp²⁰⁶ aparece conservado en las lacasas de basidiomicetos. La Cys 205 está implicada en la formación de uno de los dos puentes disulfuro que estabilizan la proteína, mientras que el Asp 206 interaccionaría con el sustrato en el bolsillo enzimático, junto con la His 456 ligando del cobre T1 (Bertrand *et al.*, 2002). El hecho de que se haya producido esta mutación en el residuo de Asn 208, muy próximo al la Cys 205 y al Asp 206 podría repercutir en modificaciones estructurales en este entorno alterando las

interacciones con el sustrato. La Ser 208 forma un nuevo puente de hidrógeno con la Gln 237, lo cual puede provocar el movimiento del Asp 206 implicado en la unión de sustrato (Figura 5.8) que podría ser responsable de cambios en la actividad catalítica de la enzima (ver apartado 5.2.5).

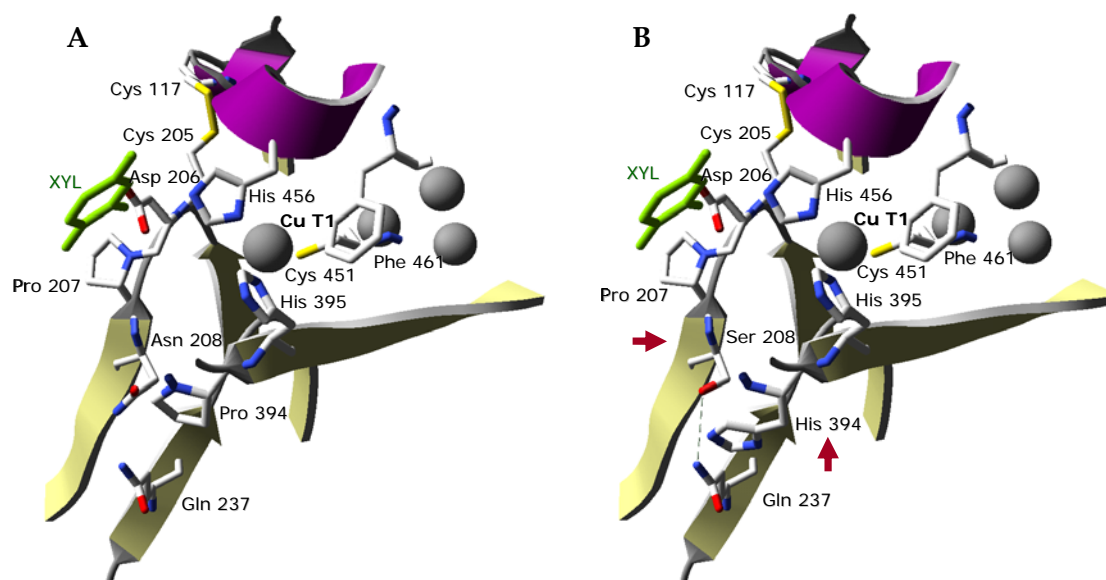


Figura 5.8. Detalle del sitio de unión a sustrato (con una molécula de xilidina interaccionando con el Asp 206) en la lacasa de *P. cinnabarinus* (A). Se muestran los ligandos del cobre T1, el puente disulfuro entre las Cys 205 y 117 y la localización de las mutaciones N208S y P394H en la variante 7A9 obtenida tras tres ciclos de evolución dirigida (B).

De las otras cuatro mutaciones aparecidas en la secuencia de la lacasa madura a lo largo de la ruta evolutiva de la lacasa de *P. cinnabarinus* (**L46I**, **S135G**, **I453V** y **D490G**), la mutación **L46I** es la más relevante. Este cambio semiconservativo de aminoácidos apolares en la superficie de la proteína aparece en el mutante 3G10 de la primera generación (donde es responsable de una mejora de actividad de 2,2 veces con respecto al parental) y se ha conservado en algunos de los mutantes seleccionados de la segunda y tercera generación. Sin embargo, no aparece en el mutante 7A9 de la tercera generación.

El mejor mutante de la última generación, **7A9**, seleccionado tras 3 ciclos evolutivos y 6000 clones explorados, acumula 8 mutaciones, de las cuales 7 fueron beneficiosas. A las cuatro mutaciones de la secuencia señal del factor α : A(α 9)D, F(α 48)S, S(α 58)G y E(α 86)G, se les atribuye la mejora en la secreción de la enzima. Tres son las mutaciones beneficiosas en la secuencia

de la proteína madura: P394H, D341N y N208S (Figura 5.9). Las mutaciones P394H y N208S, del entorno del cobre T1, parecen responsables de la mejora en la actividad catalítica de la enzima. Mientras que la mutación D341N, en la superficie de la proteína, podría estar relacionada con mejoras en la secreción, tal y como se ha comentado anteriormente.

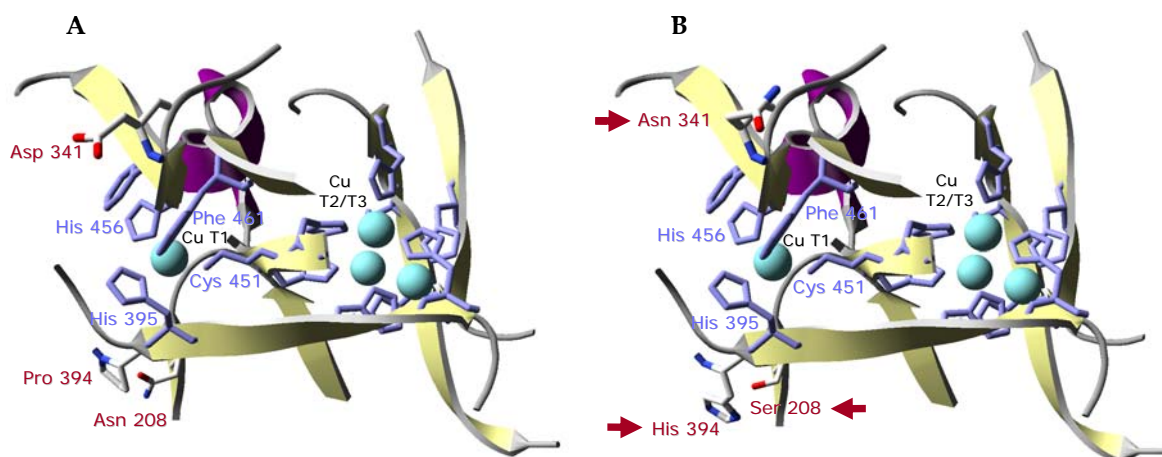


Figura 5.9. Detalle de la estructura tridimensional de la lacasa de *P. cinnabarinus*. Se muestran los 4 cobres catalíticos y sus ligandos en azul. En rojo se indican los residuos de la lacasa nativa (A) mutados en la variante 7A9 obtenida por evolución dirigida (B).

5.2.4. MUTAGÉNESIS DE LOS RESIDUOS R(α 2)S Y A240P MEDIANTE IVOE

La mutación R(α 2)S, que apareció en el mutante 3D3 de la primera generación y se mantuvo en tres de los seis clones seleccionado en la segunda generación, se perdió durante el barajado *in vivo* de la tercera generación. Esta mutación supuso importantes mejoras en la actividad lacasa total por lo que se intentó introducirla en la variante 7A9 mediante la técnica de IVOE.

Aprovechando la versatilidad y eficiencia de esta técnica se decidió introducir la mutación A240P simultáneamente, debido a la alta homología de secuencia existente entre la lacasa de *P. cinnabarinus* y la lacasa PM1 (73 % de identidad de secuencia), en cuyo proceso de evolución dirigida este cambio aminoacídico se reveló como una mutación determinante.

Ninguno de los clones de la librería generada por IVOE presentó una mejora de actividad con respecto al parental 7A9. De entre los mutantes negativos secuenciados se pudo detectar la mutación A240P. Sin embargo, la mutación R(α 2)S no pudo hallarse en ninguno de los mutantes

secuenciados, ni sola, ni en combinación con la mutación A240P. Este resultado indicaría la incompatibilidad existente entre la mutación A(α 9)D y la R(α 2)S para obtener una enzima secretada activa, tal y como se había puesto de manifiesto en el segundo ciclo de evolución, donde se había visto que los mejores clones seleccionados o bien contenían la mutación A(α 9)D o bien la R(α 2)S.

El hecho de que ninguna de las dos mutaciones, A240P y R(α 2)S, por separado o combinadas, produjeran mejoras en la variante 7A9, pone de manifiesto que la estrategia de evolución dirigida y los métodos de *high-throughput screening* empleados son adecuados para seleccionar las mutaciones beneficiosas que van surgiendo a lo largo del proceso evolutivo. La mutación R(α 2)S no se seleccionó en la tercera generación porque no mejora la secreción de lacasa en los mutantes que portan la mutación A(α 9)D. Por otro lado, A240P no fue seleccionada en el proceso evolutivo de la lacasa de *P. cinnabarinus*, donde no es beneficiosa, aunque sí fue seleccionada durante la evolución en el laboratorio de la lacasa de PM1, donde sí mejora significativamente los niveles de actividad.

5.2.5. CARACTERIZACIÓN DE LA VARIANTE 7A9

La lacasa salvaje purificada de *P. cinnabarinus* migró como una banda de aproximadamente 65 kDa en la electroforesis SDS-PAGE, y sin embargo, la variante evolucionada 7A9 migra con una masa molecular de 120 kDa. Las lacasas son secretadas al medio como glicoproteínas (Yaropolov *et al.*, 1994), y concretamente en la lacasa de *P. cinnabarinus* se han descrito cinco sitios de glicosilación en residuos de Asn (Otterbein *et al.*, 2000). La diferencia en la masa molecular de ambas proteínas es debida a residuos de oligosacáridos adicionales presentes en 7A9 como consecuencia de la hiperglicosilación sufrida en el organismo hospedador, *S. cerevisiae*. Dicha hiperglicosilación no inhibió la actividad lacasa como se ha demostrado por su detección en el medio de cultivo.

El tratamiento con N-desglicosidasa y el posterior análisis por SDS-PAGE puso de manifiesto que 7A9 se encuentra hiperglicosilada aproximadamente en un 50 % de su masa total. Empleando el servidor Expasy, www.Expasy.org, se calculó la masa molecular teórica en 54,3 kDa, un 9,5 % menos de lo observado experimentalmente para 7A9 N-desglicosilada. Esta diferencia en la masa molecular puede ser debida a las

O-glicosilaciones durante el procesamiento de la enzima en el aparato de Golgi. La ligera diferencia en las masas moleculares de la variante 7A9 N-desglicosilada y la lacasa salvaje se deben al pequeño porcentaje de glicosilación que posee esta última enzima.

Tanto la estabilidad a la temperatura como el pH óptimo de la enzima se vieron afectados por el proceso de evolución dirigida en *S. cerevisiae*. La variante 7A9 retuvo un 30 % más de actividad que la lacasa de *P. cinnabarinus* salvaje tras 2 h de incubación a 55 °C y hasta un 25 % más tras 24 h de incubación a 40 °C. Su pH óptimo se vio desplazado hacia pHs más neutros.

Si bien el aumento de la estabilidad enzimática puede deberse en parte, a la diferencia en la composición de carbohidratos de ambas enzimas (Record *et al.*, 2002; Bulter *et al.*, 2003b), no hay que descartar que se deba también al propio proceso evolutivo. De hecho, en la primera generación, se hizo un *re-screening* de termoestabilidad donde varios de los mejores mutantes de actividad seleccionados como parentales para la segunda generación, mostraron una mayor estabilidad a la temperatura que el parental. El aumento de actividad de la variante 7A9 a pH 4,0-5,0 sí parece ser consecuencia de la presión selectiva de la ruta evolutiva, ya que los ensayos colorimétricos se realizaron a pH 5,0 que es claramente más neutro que el pH óptimo de la enzima.

La variante 7A9 fue activa frente a sustratos de diferente naturaleza, con eficiencias catalíticas en el intervalo 100-1500 mM⁻¹ s⁻¹, lo que pone de manifiesto que el método de *screening* empleado en esta tesis facilita la selección de variantes funcionales frente a diferentes compuestos.

7A9 mostró eficiencias de oxidación de ABTS 5,7 veces superior que la lacasa salvaje de *P. cinnabarinus* ya que la afinidad de la variante por este sustrato aumentó significativamente como indica su K_m . Sin embargo, su eficiencia para el sustrato fenólico DMP fue menor, ya que a pesar de que la velocidad de transformación de sustrato en producto aumenta, la afinidad se reduce a la mitad. Este hecho podría explicarse por una modificación del entorno del Asp 206, implicado en la oxidación de compuestos fenólicos en la lacasa de *T. versicolor* (Bertrand *et al.*, 2002), como consecuencia de la mutación N208S, muy próxima a dicho residuo. Se ha descrito el posible papel del Asp 206 en la modulación de la oxidación de fenoles debido a su pKa (3,9), haciendo que la afinidad por estos sustratos a pH 5,0 (carboxilo

disociado) sea mayor que a pH más ácido. En la variante 7A9, el nuevo puente de hidrógeno entre Ser 208 y Gln 237 produciría un ligero desplazamiento del Asp 206 que podría afectar a su afinidad por compuestos fenólicos, como demuestra la disminución de la afinidad por el DMP.

La existencia de una metodología sistemática de alta capacidad es un paso clave en el diseño de lacasas para diferentes aplicaciones biotecnológicas. La variante 7A9, obtenida por evolución dirigida en el laboratorio a partir de una lacasa de alto potencial redox, puede ser el punto de partida para el diseño no racional de lacasas con nuevas especificidades y características (elevada actividad en medio alcalino, alta especificidad hacia ciertos sustratos, estabilidad a elevadas temperaturas o en presencia de disolventes orgánicos, etc) en función de las necesidades de la industria o la aplicación biotecnológica concreta a la que se quiera destinar.

6. Conclusiones

1. Los ácidos *p*-hidroxicinnámicos poseen un fuerte carácter antioxidante debido a su naturaleza fenólica y al doble enlace conjugado de su cadena lateral. La presencia de sustituyentes metoxilos en el anillo fenólico aumentó la capacidad antioxidante de estos compuestos y, por tanto, la eficiencia de su oxidación por lacasa.
2. Se ha demostrado la capacidad de los compuestos fenólicos relacionados con la lignina para actuar como mediadores redox de lacasa en la oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y colorantes.
3. El ácido *p*-cumárico promovió muy significativamente la oxidación de antraceno, benzo[a]pireno y pireno por lacasa. La eficiencia de este mediador fue equivalente a la del HBT, produciendo una mayor detoxificación.
4. Se detectaron quinonas como productos de oxidación de antraceno y benzo[a]pireno por lacasa y mediadores naturales (y artificiales). La presencia de 6-benzo[a]pirenil acetato como producto de oxidación del benzo[a]pireno por lacasa-ABTS confirmó su mecanismo de oxidación (vía ET), mientras que su ausencia evidenció que el sistema lacasa-PCU comparte el mismo mecanismo de oxidación (vía HAT) que el sistema lacasa-HBT.
5. Se ha demostrado la capacidad del ácido *p*-cumárico para peroxidar lípidos insaturados una vez oxidado por la lacasa. Esta capacidad es utilizada por el sistema lacasa-PCU para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos más recalcitrantes como el fenantreno.
6. El ácido sinápico fue el mediador natural más rápido y eficaz en la decoloración de diferentes tipos de colorantes por lacasa. El acoplamiento de sus radicales fenoxilo origina dímeros fenólicos que actuarían como mediadores en dicho proceso.
7. La lacasa de *P. cinnabarinus* se expresó funcionalmente en la levadura *S. cerevisiae* empleando la secuencia del pre-propéptido del factor α (α -PcL) y añadiendo etanol y cobre (rango mM) al medio de

expresión. La disminución de la temperatura de incubación a 20 °C aumentó significativamente la producción de enzima.

8. La estrategia de evolución de la enzima consistió en: 1) someter la secuencia α -PcL completa al proceso evolutivo; 2) generar diversidad génica mediante mutagénesis aleatoria con dos polimerasas distintas para obtener genotecas con diferente espectro mutacional, y recombinarlas *in vivo* en la levadura; y 3) realizar el ensayo sistemático de exploración y selección de actividad lacasa con dos sustratos diferentes (ABTS y DMP).
9. Tras completar tres ciclos de evolución dirigida se han aumentado los niveles de actividad lacasa producida en *S. cerevisiae* 800 veces en microcultivo, llegando hasta 40 U/L en matraz. Esto se ha conseguido gracias a la incorporación y acumulación de mutaciones beneficiosas tanto en el pre-propéptido del factor α , como en la secuencia de la proteína madura.
10. El mejor mutante 7A9, obtenido tras el proceso de evolución en laboratorio, acumula 7 mutaciones beneficiosas. A las cuatro mutaciones de la secuencia señal del factor α se les atribuye la mejora en la secreción de la enzima. Las otras tres mutaciones se localizan en la secuencia de la proteína madura. Las dos mutaciones del entorno del cobre T1, P394H y N208S, parecen responsables de la mejora en la actividad catalítica de la enzima. La tercera, D341N, se localiza en la superficie de la proteína, pudiendo estar relacionada con mejoras en la secreción o con cambios estructurales.
11. La variante 7A9 fue purificada y parcialmente caracterizada. Esta variante presentó una mayor termoestabilidad, un pH óptimo más neutro y una mayor eficiencia en la oxidación de ABTS que la lacasa salvaje de *P. cinnabarinus*.

7. Bibliografía

A

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco Paulo, A., y Gübitz, G. M. (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3357-3362
- Abdelmoula-Souissi, S., Rekik, L., Gargouri, A., y Mokdad-Gargouri, R. (2007) High-level expression of human tumour suppressor P53 in the methylotrophic yeast: *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 54:283-288
- Abecassis, V., Pompon, D., y Truan, G. (2000) High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Res* 28:E88
- Affholter, J. y Arnold, F. H. (1999) Engineering a revolution. *Chemtech* 29:34-39
- Ahn, M. Y., Dec, J., Kim, J. E., y Bollag, J. M. (2002) Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *J. Environ. Qual.* 31:1509-1515
- Alcalde, M., Bulter, T., y Arnold, F. H. (2002) Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *J. Biomol. Screen.* 7:547-553
- Alcalde, M., Zumarraga, M., Polaina, J., Ballesteros, A., y Plou, F. J. (2006) Combinatorial saturation mutagenesis by in vivo overlap extension for the engineering of fungal laccases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9:719-727
- Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J. L., Goma, G., Molina-Jouve, C., y Guillouet, S. E. (2004) Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:537-542
- Alves, A. M., Record, E., Lomascolo, A., Scholtmeijer, K., Asther, M., Wessels, J. G., y Wosten, H. A. (2004) Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6379-6384
- Amann, M. (1997) The Lignozym[®] process coming closer to the mill. *Proc. 9th ISWPC, Montreal, May*:F4-1-F4-5

- Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D., y Hadar, Y. (1998) Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS Lett.* 438:195-200
- Antorini, M., Herpoël-Gimbert, I., Choinowski, T., Sigoillot, J. C., Asther, M., Winterhalter, K., y Piontek, K. (2002) Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. *BBA Protein Struct. Mol. Enzym.* 1594:109-114
- Aramayo, R. y Timberlake, W. E. (1990) Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* *yA* (laccase I) gene. *Nucleic Acids Res.* 18:3415
- Archibald, F. S. (1992) A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure-B. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3110-3116
- Arnold, F. H. (1988) Protein Design for Non-Aqueous Solvents. *Protein Eng.* 2:21-25
- Arnold, F. H. (1998) When blind is better: Protein design by evolution. *Nature Biotechnology* 16:617-618
- Arnold, F. H. y Volkov, A. A. (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:54-59
- Arrieta-Baez, D. y Stark, R. E. (2006) Modeling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: Cross-coupling and dimerization reactions. *Phytochemistry* 67:743-753
- Arts, M. J. T. J., Sebastiaan, D. J., Voss, H. P., Haenen, G. R. M. M., y Bast, A. (2004) A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* 88:567-570
- Atienzar, F. A., Conradi, M., Evenden, A. J., Jha, A. N., y Depledge, M. H. (1999) Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:2275-2282

B

- Baborova, P., Moder, M., Baldrian, P., Cajthamlova, K., y Cajthaml, T. (2006) Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 157:248-253
- Bajpai, P., Anand, A., Sharma, N., Mishra, S. P., Bajpai, P. K., y Lachenal, D. (2006) Enzymes improve ECF bleaching of pulp. *Bioresources* 1:34-44
- Baker, W. L., Sabapathy, K., Vibat, M., y Lonergan, G. (1996) Laccase catalyzes formation of an indamine dye between 3- methyl- 2-benzothiazolinone hydrazone and 3- dimethylaminobenzoic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 18:90-94
- Baldrian, P. (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30:215-242
- Bao, W., Omalley, D. M., Whetten, R., y Sederoff, R. R. (1993) A Laccase Associated with Lignification in Loblolly Pine Xylem. *Science* 260:672-674
- Bao, W. L., Fukushima, Y., Jensen, K. A., Moen, M. A., y Hammel, K. E. (1994) Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett.* 354:297-300
- Baratto, L., Candido, A., Marzorati, M., Sagui, F., Riva, S., y Danieli, B. (2006) Laccase-mediated oxidation of natural glycosides. *J. Mol. Cat. B:Enzym.* 39:3-8
- Barr, P. J., Steimer, K. S., Sabin, E. A., Parkes, D., Georgenascimento, C., Stephans, J. C., Powers, M. A., Gyenes, A., Vannest, G. A., Miller, E. T., Higgins, K. W., y Luciw, P. A. (1987) Antigenicity and Immunogenicity of Domains of the Human-Immunodeficiency-Virus (Hiv) Envelope Polypeptide Expressed in the Yeast *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Vaccine* 5:90-&
- Barton, S. C., Kim, H. H., Binyamin, G., Zhang, Y. C., y Heller, A. (2001) The "wired" laccase cathode: High current density electroreduction of O₂ to water at +0.7 V (NHE) at pH 5. *J. Am. Chem. Soc.* 123:5802-5803
- Bauer, C. G., Kuhn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P. J., Bruce, N. C., Makower, A. A., Lowe, C. R., y Scheller, F. W. (1999) New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 364:179-183

- Bertrand, G. (1896) Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Seances Acad Sci* 123:463-465
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., y Mougin, C. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41:7325-7333
- Bidlack, J., Malonge, M., y Benson, R. (1992) Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. Okla. Acad. Sci.* 72:51-56
- Bitter, G. A., Chen, K. K., Banks, A. R., y Lai, P. H. (1984) Secretion of Foreign Proteins from *Saccharomyces-Cerevisiae* Directed by Alpha-Factor Gene Fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81:5330-5334
- Blázquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarra, M., Caminal, G., y Vicent, T. (2004) Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Res.* 38:2166-2172
- Bogan, B. W. y Lamar, R. T. (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1597-1603
- Bohmer, S., Messner, K., y Srebotnik, E. (1998) Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:233-238
- Bollag, J. M., Chu, H. L., Rao, M. A., y Gianfreda, L. (2003) Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *J. Environ. Qual.* 32:63-69
- Bollag, J.-M., Liu, S.-Y., y Minard, R. D. (1980) Cross-coupling of phenolic humus constituents and 2,4-dichlorophenol. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44:52-76
- Bollag, J.-M., Sutherland, K. L., y Anderson, D. H. (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:3086-3091
- Bors, W. y Saran, M. (1987) Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic Res Commun* 2:289-294
- Bourbonnais, R. y Paice, M. G. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102

- Bourbonnais, R. y Paice, M. G. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:823-827
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E., y Borneman, S. (1997a) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4627-4632
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Leech, D., y Freiermuth, B. (1997b) Reactivity and mechanism of laccase mediators for pulp delignification. *Proc. TAPPI Biol. Sci. Symp.*, San Francisco, 19-23 October:335-338
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Brake, A. J., Merryweather, J. P., Coit, D. G., Heberlein, U. A., Masiarz, F. R., Mullenbach, G. T., Urdea, M. S., Valenzuela, P., y Barr, P. J. (1984) Alpha-Factor-Directed Synthesis and Secretion of Mature Foreign Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81:4642-4646
- Branchi, B., Galli, C., y Gentili, P. (2005) Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox. *Org. Biomol. Chem.* 3:2604-2614
- Breuil, A. C., Jeandet, P., Adrian, M., Chopin, F., Pirio, N., Meunier, P., y Bessis, R. (1999) Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89:298-302
- Buege, J. A. y Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310
- Bulter, T. y Alcalde, M. (2003a) Preparing libraries in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 231:17-22
- Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., y Arnold, F. H. (2003b) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:987-995
- Bumpus, J. A. (1989) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:154-158
- Buswell, J. A. y Odier, E. (1987) Lignin biodegradation. *Crit Rev. Biotechnol.* 6:1-60

C

- Cajthaml, T., Moder, M., Kacer, P., Sasek, V., y Popp, P. (2002) Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* 974:213-222
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J. C., Gutiérrez, A., Gras, J. M., Monje, R., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. (2004) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme Microb. Technol.* 35:113-120
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J. C., Gutiérrez, A., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. (2002) Flax pulp bleaching and residual lignin modification by laccase-mediator systems. Viikari, L. and Lantto, R. *Biotechnology in the pulp and paper industry* *Progr. Biotechnol.* 21:213-222 London, Elsevier
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, A. T., Romero, J., Gutiérrez, A., y del Río, J. C. (2007) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb. Technol.* 40:1264-1271
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1775-1784
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. (1999) Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* 274:10324-10330
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., y Gübitz, G. M. (2001) Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J. Biotechnol.* 89:131-139
- Cañas, A., Alcalde, M., Plou, F. J., Martínez, M. J., Martínez, A. T., y Camarero, S. (2006) Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environ. Sci. Technol.* 41:2964-2971
- Cantarella, G., Galli, C., y Gentili P. (2003) Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase-mediator systems. Catalytic and stoichiometric procedures. *J. Mol. Cat. B:Enzym.* 22:135-144

- Cassland, P. y Jönsson, L. J. (1999) Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:393-400
- Castañó, A. y Becerril, C. (2004) In vitro assessment of DNA damage after short- and long-term exposure to benzo(a)pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552:141-151
- Cerniglia, C. E. (1985) Metabolism of 1-nitropyrene and 6-nitrobenzo(a)pyrene by intestinal microflora. *Prog Clin Biol Res* 181:133-137
- Cerniglia, C. E. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351-368
- Chandra, R. P. y Ragauskas, A. J. (2002) Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme Microb. Technol.* 30:855-861
- Chen, C. K. J., Shokhireva, T. K., Berry, R. E., Zhang, H. J., y Walker, F. A. (2008) The effect of mutation of F87 on the properties of CYP102A1-CYP4C7 chimeras: altered regiospecificity and substrate selectivity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13:813-824
- Chen, C. L., Potthast, A., Rosenau, T., Gratzl, J. S., Kirkman, A. G., Nagai, D., y Miyakoshi, T. (2000) Laccase-catalyzed oxidation of 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-propene using ABTS as mediator. *J. Mol. Cat. B:Enzym.* 8:213-219
- Chen, C.-L. y Chang, H. (1985) Chemistry of lignin biodegradation. Higuchi, T. Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components:535-555 Orlando, Academic Press
- Chen, R. D. (2001) Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends Biotechnol.* 19:13-14
- Cherry, J. R. y Fidantsef, A. L. (2003) Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:438-443
- Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., y Pedersen, A. H. (1999) Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnol.* 17:379-384
- Chivukula, M. y Renganathan, V. (1995) Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4374-4377

- Cirino, P. C., Mayer, K. M., y Umeno, D. (2003) Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol Biol* 231:3-9
- Claus, H. (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35:93-96
- Claus, H., Faber, G., y König, H. (2002) Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:672-678
- Coco, W. M., Levinson, W. E., Crist, M. J., Hektor, H. J., Darzins, A., Pienkos, P. T., Squires, C. H., y Monticello, D. J. (2001) DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nature Biotechnology* 19:354-359
- Collins, P. J., Kotterman, M. J. J., Field, J. A., y Dobson, A. D. W. (1996) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4563-4567
- Cortassa, S., Aon, J. C., y Aon, M. A. (1995) Fluxes of Carbon, Phosphorylation, and Redox Intermediates During Growth of *Saccharomyces-Cerevisiae* on Different Carbon-Sources. *Biotechnol. Bioeng.* 47:193-208
- Crawford, R. L. (1981) Lignin biodegradation and transformation. New York, Wiley Interscience
- Cuvelier, M. E., Richard, H., y Berset, C. (1992) Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-Phenols - Structure Activity Relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56:324-325

D

- d'Acunzo, F. y Galli, C. (2003) First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *Eur. J. Biochem.* 270:3634-3640
- Daniel, G., Nilsson, T., y Pettersson, B. (1989) Intra- and extracellular localization of lignin peroxidase during the degradation of solid wood and wood fragments by *Phanerochaete chrysosporium* by using transmission electron microscopy and immuno-gold labeling. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:871-881
- Daquino, C. y Foti, M. C. (2006) Coupling and fast decarboxylation of aryloxyl radicals of 4-hydroxycinnamic acids with formation of stable p-quinomethanes. *Tetrahedron* 62:1536-1547
- Darwin, C. (1859) The origin of species. London, John Murray; Albemarle Street

- Davies, G. J. y Ducros, V. (2001) Laccase. Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and Wieghardt, K. Handbook of metalloproteins Ltd. Chichester, West Sussex, John Wiley and Sons
- Dawel, G., Kastner, M., Michels, J., Poppitz, W., Gunther, W., y Fritsche, W. (1997) Structure of a laccase-mediated product of coupling of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2560-2565
- De Souza, C. G. M., Tychanowicz, G. K., De Souza, D. F., y Peralta, R. M. (2004) Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J. Basic Microb.* 44:129-136
- Dec, J. y Bollag, J. M. (2000) Phenoloxidase-mediated interactions of phenols and anilines with humic materials. *J. Environ. Qual.* 29:665-676
- Djomo, J. E., Dauta, A., Ferrier, V., Narbonne, J. F., Monkiedje, A., Njine, T., y Garrigues, P. (2004) Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. *Water Res.* 38:1817-1821
- Djurdjevic, L., Mitrovic, M., Pavlovic, P., Gajic, G., y Kostic, O. (2006) Phenolic acids as bioindicators of fly ash deposit revegetation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50:488-495
- Ducros, V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Brown, S. H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D. S., Pedersen, A. H., y Davies, G. J. (1998) Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Struct. Biology* 5:310-316
- Durant, J. L., Busby, W. F., Lafleur, A. L., Penman, B. W., y Crespi, C. L. (1996) Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutation Research-Genetic Toxicology* 371:123-157
- Durao, P., Bento, I., Fernandes, A. T., Melo, E. P., Lindley, P. F., y Martins, L. O. (2006) Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11:514-526

E

- Eckert, K. A. y Kunkel, T. A. (1990) High Fidelity Dna-Synthesis by the *Thermus-Aquaticus* Dna-Polymerase. *Nucleic Acids Res.* 18:3739-3744
- Eggert, C., Lafayette, P. R., Temp, U., Eriksson, K. E. L., y Dean, J. F. D. (1998) Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1766-1772
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D., y Eriksson, K.-E. L. (1996a) A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391:144-148
- Eggert, C., Temp, U., y Eriksson, K. E. L. (1996b) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1151-1158
- Eibes, G., Cajthaml, T., Moreira, M. T., Feijoo, G., y Lema, J. M. (2006) Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64:408-414
- Eibes, G. M., Lu-Chau, T. A., Ruiz-Duenas, F. J., Feijoo, G., Martinez, M. J., Martinez, A. T., y Lema, J. M. (2009) Effect of culture temperature on the heterologous expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Aspergillus* hosts. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32:129-134
- Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O., y Carrondo, M. A. (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* 278:19416-19425
- Eom, I. C., Rast, C., Veber, A. M., y Vasseur, P. (2007) Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotox. Environ. Safe.* 67:190-205
- Ernst, J. F. (1986) Improved Secretion of Heterologous Proteins by *Saccharomyces-Cerevisiae* - Effects of Promoter Substitution in Alpha-Factor Fusions. *Dna-A Journal of Molecular & Cellular Biology* 5:483-491
- Esterbauer, H. y Cheeseman, K. H. (1990) Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products Malonaldehyde and 4 Hydroxynonenal. 407-421

Evans, C. S., Dutton, M. V., Guillén, F., y Veness, R. G. (1994) Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:235-240

F

Fabbrini, M., Galli, C., y Gentili, P. (2002) Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J. Mol. Cat. B:Enzym.* 16:231-240

Fan, X. y Deng, Y. (2002) Separation and identification of aromatic acids in soil and the Everglades sediment samples using solid-phase microextraction followed by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* 979:417

Farinas, E. T., Bulter, T., y Arnold, F. H. (2001) Directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:545-551

Farver, O., Skov, L. K., Pascher, T., Karlsson, B. G., Nordling, M., Lundberg, L. G., Vanngard, T., y Pecht, I. (1993) Intramolecular Electron-Transfer in Single-Site-Mutated Azurins. *Biochemistry* 32:7317-7322

Felbeck, G. T. (1971) Structural hypotheses of soil humic acids. *Soil Sci.* 111:42-&

Felby, C., Pedersen, L. S., y Nielsen, B. R. (1997) Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung* 51:281-286

Foti, M. C., Daquino, C., y Geraci, C. (2004) Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH center dot radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* 69:2309-2314

Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J., y German, J. B. (1994) Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants - Bulk Oils Vs Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 42:1054-1059

Freire, R. S., Duran, N., y Kubota, L. T. (2001) Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta* 54:681-686

Freudenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E., y Stohrer, J. (1998) Understanding the Lignozyme®-process. *Proc. Intern. Pulp Bleaching Conf. , Helsinki, 1-5 June* 1:71-76

G

- Gamelas, J. A. F., Pontes, A. S. N., Evtuguin, D. V., Xavier, A. M. R. B., y Esculcas, A. P. (2007) New polyoxometalate-laccase integrated system for kraft pulp delignification. *Biochemical Engineering Journal* 33:141-147
- Gamelas, J. A. F., Tavares, A. P. M., Evtuguin, D. V., y Xavier, A. M. B. (2005) Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying a novel multi-stage process. *J. Mol. Cat. B:Enzym.* 33:57-64
- Garavaglia, S., Cambria, M. T., Miglio, M., Ragusa, S., Lacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., y Rizzi, M. (2004) The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J. Mol. Biol.* 342:1519-1531
- García, O., Camarero, S., Colom, J., Martínez, A. T., Martínez, M. J., Monje, R., y Vidal, T. (2003) Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57:513-519
- Georis, J., Lomascolo, A., Camarero, S., Dorgeo, V., Herpoël, I., Asther, M., Martínez, A. T., y Dauvrin, T. (2003) *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: an interesting tool for food or non-food applications. *Proc. FAB2003, Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen* (in press)
- Gianfreda, L., Xu, F., y Bollag, J. M. (1999) Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal* 3:1-26
- Gianfreda, L. y Rao, M. A. (2004) Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 35:339-354
- Gibbs, M. D., Nevalainen, K. M. H., y Bergquist, P. L. (2001) Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene* 271:13-20
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M. L., y Bally, R. (1993) Polyphenol Oxidase in *Azospirillum-Lipoferum* Isolated from Rice Rhizosphere - Evidence for Laccase Activity in Nonmotile Strains of *Azospirillum-Lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 108:205-210
- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., y Gold, M. H. (1983) An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:1077-1083

- Goddard, J. P. y Reymond, J. L. (2004) Enzyme assays for high-throughput screening. *Current Opinion in Biotechnology* 15:314-322
- Gorbacheva, M., Morozova, O., Shumakovich, G., Streltsov, A., Shleev, S., y Yaropolov, A. (2009) Enzymatic oxidation of manganese ions catalysed by laccase. *Bioorg Chem* 37:1-5
- Graf, E. (1992) Antioxidant Potential of Ferulic Acid. *Free Radical Biology and Medicine* 13:435-448
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. (2000) Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 383:142-147
- Guillén, F., Martínez, A. T., Martínez, M. J., y Evans, C. S. (1994) Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:465-470
- Gutiérrez, A., del Río, J. C., Rencoret, J., Ibarra, D., Speranza, A. M., Camarero, S., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. (2006) Sistema enzima-mediador para el control de los depósitos de *pitch* en la fabricación de pasta y papel. *Patent (International)* PCT/ES06/070091
- Gutiérrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Río, J. C., y Martínez, A. T. (2007) Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environ. Sci. Technol.* 41:4124-4129

H

- Haemmerli, S. D., Leisola, M. S. A., Sanglard, D., y Fiechter, A. (1986) Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. Veratryl alcohol and stability of ligninase. *J. Biol. Chem.* 261:6900-6903
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L. L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., y Rouvinen, J. (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat. Struct. Biol.* 9:601-605
- Hammel, K. E. (1997) Fungal degradation of lignin. Cadisch, G. and Giller, K. E. Plant litter quality and decomposition:33-45 London, CAB International

- Hammel, K. E., Gai, W. Z., Green, B., y Moen, M. A. (1992) Oxidative Degradation of Phenanthrene by the Ligninolytic Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1832-1838
- Hammel, K. E., Green, B., y Gai, W. Z. (1991) Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10605-10608
- Hanrahan, C. J., Bacolod, M. D., Vyas, R. R., Liu, T. M., Geacintov, N. E., Loechler, E. L., y Basu, A. K. (1997) Sequence specific mutagenesis of the major (+)-anti-benzo[a]pyrene diol epoxide DNA adduct at a mutational hot spot in vitro and in *Escherichia coli* cells. *Chemical Research in Toxicology* 10:369-377
- Hao, O. J., Kim, H., y Chiang, P. C. (2000) Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30:449-505
- Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M., y Szewzyk, U. (1998) Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2788-2793
- Herpoël, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J. C., y Asther, M. (2000) Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiol. Lett.* 9190:1-6
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., y Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59
- Hofmann, K. J. y Schultz, L. D. (1991) Mutations of the Alpha-Galactosidase Signal Peptide Which Greatly Enhance Secretion of Heterologous Proteins by Yeast. *Gene* 101:105-111
- Hopia, A. I., Huang, S. W., Schwarz, K., German, J. B., y Frankel, E. N. (1996) Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without alpha-tocopherol. *J. Agric. Food Chem.* 44:2030-2036
- Hoshida, H., Fujita, T., Murata, K., Kubo, K., y Akada, R. (2005) Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:1090-1097

- Hou, H. M., Zhou, J. T., Wang, J., Du, C. H., y Yan, B. (2004) Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem.* 39:1415-1419
- Huttermann, A., Mai, C., y Kharazipour, A. (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:387-394
- Hüttermann, A., Milstein, O., Nicklas, B., Trojanowski, J., Haars, A., y Kharazipour, A. (1989) Enzymatic modification of lignin for technical use. Strategies and results. Lignin. Properties and materials: 361-370 Washington, ACS (ACS Symp. Ser. 397)

I

- Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. (2006a) Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine free bleaching eucalypt kraft pulp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81:1159-1165
- Ibarra, D., Romero, J., Martínez, M. J., Martínez, A. T., y Camarero, S. (2006b) Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. *Enzyme Microb. Technol.* 39:1319-1327
- Iffland, A., Tafelmeyer, P., Saudan, C., y Johnsson, K. (2000) Directed molecular evolution of cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 39:10790-10798
- Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., y Yamamoto, H. (2000) Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biol. Biochem.* 32:85-91

J

- Jauregui, J., Valderrama, B., Albores, A., y Vázquez-Duhalt, R. (2003) Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation* 14:397-406
- Jeftic, L. y Adams, R. N. (1969) Electrochemical Oxidation Pathways of Benzo (a) Pyrene. *Abs. Papers Amer. Chem. Soc.* 92:1332-1337
- Jensen, K. A. Jr., Bao, W., Kawai, S., Srebotnik, E., y Hammel, K. E. (1996) Manganese-dependent cleavage of non-phenolic lignin structures by

- Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3679-3686
- Jeon, J. R., Murugesan, K., Kim, Y. M., Kim, E. J., y Chang, Y. S. (2008) Synergistic effect of laccase mediators on pentachlorophenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:783-790
- Johannes, C. y Majcherczyk, A. (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:524-528
- Johannes, C., Majcherczyk, A., y Hüttermann, A. (1996) Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:313-317
- Johannes, C., Majcherczyk, A., y Hüttermann, A. (1998) Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. *J. Biotechnol.* 61:151-156
- Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F., y Bollag, J. M. (1997) Transformation of 2-hydroxydibenzofuran by laccases of the white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products. *Biodegradation* 8:321-328
- Jonsson, L. J., Saloheimo, M., y Penttilä, M. (1997) Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *Icc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics* 32:425-430
- Joo, H., Lin, Z. L., y Arnold, F. H. (1999) Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature* 399:670-673

K

- Kanally, R. A. y Harayama, S. (2000) Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182:2059-2067
- Kang, K. H., Dec, J., Park, H., y Bollag, J. M. (2002) Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. *Water Res.* 36:4907-4915
- Kawai, S., Umezawa, T., y Higuchi, T. (1989) Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde. *Wood Res.* 76:10-16

- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., Koide, K., Nishida, T., Morohoshi, N., y Haraguchi, T. (1987) C α -C β cleavage of phenolic β -1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. *Mokuzai Gakkaishi* 33:792-797
- Kersten, P. J. y Kirk, T. K. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169:2195-2201
- Keum, Y. S. y Li, Q. X. (2004) Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56:23-30
- Kingsman, S. M., Kingsman, A. J., Dobson, M. J., Mellor, J., y Roberts, N. A. (1985) Heterologous Gene-Expression in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 3:377-416
- Kirk, T. K. y Farrell, R. L. (1987) Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505
- Ko, E. M., Leem, Y. E., y Choi, H. T. (2001) Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:98-102
- Kokol, V., Doliska, A., Eichlerova, I., Baldrian, P., y Nerud, F. (2007) Decolorization of textile dyes by whole cultures of *Ischnoderma resinosa* and by purified laccase and Mn-peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 40:1673-1677
- Kolkman, J. A. y Stemmer, W. P. C. (2001) Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nature Biotechnology* 19:423-428
- Koski, A., Pekkarinen, S., Hopia, A., Wahala, K., y Heinonen, M. (2003) Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *European Food Research and Technology* 217:110-114
- Kuiters, A. T. y Denneman, C. A. J. (1987) Water-soluble phenolic substances in soils under several coniferous and deciduous tree species. *Soil Biol. Biochem.* 19:765-769
- Kumar, S. V. S., Phale, P. S., Durani, S., y Wangikar, P. P. (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng.* 83:386-394

Kunamneni, A., Camarero, S., Garcia-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., y Alcalde, M. (2008) Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7

Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., y Gold, M. H. (1984) Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169:247-250

Kuznetsov, B. A., Shumakovich, G. P., Koroleva, O. V., y Yaroplov, A. I. (2001) On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 16:425

L

Lacki, K. y Duvnjak, Z. (1998) Transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenol oxidase from the fungus *Trametes versicolor*: Product elucidation studies. *Biotechnol. Bioeng.* 57:694-703

Lam, T. B. T., Iiyama, K., y Stone, B. A. (1994) Determination of etherified hydroxycinnamic acids in cell walls of grasses. *Phytochemistry* 36:773-775

Lampi, M. A., Gurska, J., McDonald, K. I. C., Xie, F. L., Huang, X. D., Dixon, D. G., y Greenberg, B. M. (2006) Photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*: Ultraviolet-mediated effects and the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon photoproducts. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:1079-1087

Lee, I. Y., Jung, K. H., Lee, C. H., y Park, Y. H. (1999) Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnol. Lett.* 21:965-968

Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., WojtasWasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., y Rogalski, J. (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microb.* 41:185-227

Leontievsky, A. A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J. K., Pozdnyakova, N. N., Myasoedova, N. M., Kalkkinen, N., Golovleva, L. A., Cammack, R., Thurston, C. F., y Hatakka, A. (1997) Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 156:9-14

- Lestan, D., Perdih, A., y Strancar, A. (1990) Influence of Some Oils and Surfactants on Lignolytic Activity, Growth and Lipid Fatty Acids of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:426-428
- Lewis, N. G. y Yamamoto, E. (1990) Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Phys.* 41:455-496
- Li, K. C., Horanyi, P. S., Collins, R., Phillips, R. S., y Eriksson, K. E. L. (2001) Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme Microb. Technol.* 28:301-307
- Lin, L., Meng, X., Liu, P. F., Hong, Y. Z., Wu, G. B., Huang, X. L., Li, C. C., Dong, J. L., Xiao, L., y Liu, Z. (2009) Improved catalytic efficiency of Endo-beta-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:671-679
- Lin, W. Z., Navaratnam, S., Yao, S. D., y Lin, N. Y. (1998) Antioxidative properties of hydroxycinnamic acid derivatives and a phenylpropanoid glycoside. A pulse radiolysis study. *Radiation Physics and Chemistry* 53:425-430
- Litthauer, D., van Vuuren, M. J., van Tonder, A., y Wolfaardt, F. W. (2007) Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme Microb. Technol.* 40:563-568
- Liu, H. L., Wan, X., Huang, X. F., y Kong, L. Y. (2007) Biotransformation of sinapic acid catalyzed by *Momordica charantia* peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* 55:1003-1008
- Lomascolo, A., Record, E., Herpoël-Gimbert, I., Delattre, M., Robert, J. L., Georis, J., Dauvrin, T., Sigoillot, J.-C., y Asther, M. (2003) Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *J. Appl. Microbiol.* 94:618-624
- Longfellow, D. G. y Seifried, H. E. (1993) Handbook of analytical and spectral data for polycyclic aromatic hydrocarbons Volume I: "Benzo[a]pyrene and its Metabolites. Midwest Research Institute
Kansas City, Missouri
- Luis, P., Walther, G., Kellner, H., Martin, F., y Buscot, F. (2004) Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 36:1025-1036

Lund, M. y Ragauskas, A. J. (2001) Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:699-703

Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G. L., Maranas, C. D., y Benkovic, S. J. (2001) Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:11248-11253

M

Mai, C., Schormann, W., Huttermann, A., Kappl, R., y Huttermann, J. (2002) The influence of laccase on the chemo-enzymatic synthesis of lignin graft-copolymers. *Enzyme Microb. Technol.* 30:66-72

Mai, C., Schormann, W., Milstein, O., y Huttermann, A. (2000) Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:510-514

Majcherczyk, A. y Johannes, C. (2000) Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *BBA Gen. Subjects* 1474:157-162

Majcherczyk, A., Johannes, C., y Hüttermann, A. (1998) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 22:335-341

Majcherczyk, A., Johannes, C., y Hüttermann, A. (1999) Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:267-276

Manivasakam, P., Weber, S. C., Mcelver, J., y Schiestl, R. H. (1995) Micro-Homology Mediated Pcr Targeting in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23:2799-2800

Marinova, E. M. y Yanishlieva, N. V. (1992) Inhibited Oxidation of Lipids .2. Comparison of the Antioxidative Properties of Some Hydroxy Derivatives of Benzoic and Cinnamic-Acids. *Fett Wissenschaft Technologie-Fat Science Technology* 94:428-432

- Marinova, E. M. y Yanishlieva, N. V. (2003) Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chem.* 81:189-197
- Marinova, E. M., Yanishlieva, N. V. I., y Kostova, I. N. (1994) Antioxidative Action of the Ethanolic Extract and Some Hydroxycoumarins of Fraxinus-Ornus Bark. *Food Chem.* 51:125-132
- Martin, A., Sieber, V., y Schmid, F. X. (2001) In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface. *Journal of Molecular Biology* 309:717-726
- Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A., y del Río, J. C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Intern. Microbiol.* 8:195-204
- Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., y Henriques, A. O. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase which occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277:18849-18859
- Maruyama, T., Komatsu, C., Michizoe, J., Sakai, S., y Goto, M. (2007) Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil. *Process Biochemistry* 42:459-461
- Marzorati, M., Danieli, B., Haltrich, D., y Riva, S. (2005) Selective laccase-mediated oxidation of sugars derivatives. *Green Chem.* 7:310-315
- Marzullo, L., Cannio, R., Giardina, P., Santini, M. T., y Sannia, G. (1995) Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.* 270:3823-3827
- Masuda, T., Yamada, K., Maekawa, T., Takeda, Y., y Yamaguchi, H. (2006) Antioxidant mechanism studies on ferulic acid: Isolation and structure identification of the main antioxidation product from methyl ferulate. *Food Science and Technology Research* 12:173-177
- May, O., Nguyen, P. T., y Arnold, F. H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nature Biotechnology* 18:317-320
- Mayer, A. M. y Staples, R. C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551-565

- Messerschmidt, A. y Huber, A. (1990) The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* 187:341-352
- Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. L., y Wieghardt, K. (2001) Handbook of metalloproteins. Nueva York, John Wiley and Sons
- Meulenberg, R., Rijnaarts, H. H. M., Doddema, H. J., y Field, J. A. (1997) Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiol. Lett.* 152:45-49
- Mills, D. R., Peterson, R. L., y Spiegel, S. (1967) An Extracellular Darwinian Experiment with A Self-Duplicating Nucleic Acid Molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58:217-&
- Minussi, R. C., Pastore, G. M., y Duran, N. (2002) Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 13:205-216
- Miyajima, A., Bond, M. W., Otsu, K., Arai, K. I., y Arai, N. (1985) Secretion of Mature Mouse Interleukin-2 by *Saccharomyces-Cerevisiae* - Use of A General Secretion Vector Containing Promoter and Leader Sequences of the Mating Pheromone Alpha-Factor. *Gene* 37:155-161
- Moen, M. A. y Hammel, K. E. (1994) Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1956-1961
- Mordukhova, E. A., Lee, H. S., y Pan, J. G. (2008) Improved Thermostability and Acetic Acid Tolerance of *Escherichia coli* via Directed Evolution of Homoserine o-Succinyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7660-7668
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., y Yaropolov, Y. I. (2007a) Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43:523-535
- Morozova, V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., y Yaropolov, A. I. (2007b) "Blue" laccases. *Biochemistry-Moscow* 72:1136-1150
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T., y Martínez, M. J. (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2166-2174

Munzenberger, B., Otter, T., Wustrich, D., y Polle, A. (1997) Peroxidase and laccase activities in mycorrhizal and non- mycorrhizal fine roots of Norway spruce (*Picea abies*) and larch (*Larix decidua*). *Can. J. Bot.* 75:932-938

Murakami, H., Hohsaka, T., y Sisido, M. (2002) Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nature Biotechnology* 20:76-81

Murphy, M. E., Lindley, P. F., y Adman, E. T. (2000) Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions. *Protein Sci.* 6:761-770

N

Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., Kanda, K., y Sato, T. (2003) Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology Sgm.* 149:2455-2462

Nikitina, O. V., Shleev, S. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Belovolova, L. V., y Yaropolov, A. I. (2005) Isolation and purification of enzymes from ligninolytic complex of the basidial fungus *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilalt and study of their properties. *Biochemistry-Moscow* 70:1274-1279

Nothwehr, S. F. y Gordon, J. I. (1990) Targeting of Proteins Into the Eukaryotic Secretory Pathway - Signal Peptide Structure-Function-Relationships. *Bioessays* 12:479-484

Nyanhongo, G. S., Gomes, J., Gübitz, G. M., Zvaunya, R., Read, J., y Steiner, W. (2002) Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res.* 36:1449-1456

O

O'Neill, C., Lopez, A., Esteves, S., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., y Wilcox, S. (2000) Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:249-254

Onuki, T., Noguchi, M., y Mitamura, J. (2000) One-pack type oxidation hair dye composition for dying hair comprises laccase in calcareous water solvent. *Patent*

Number(s): WO200037030-A; WO200037030-A1; AU200016912-A; EP1142561-A1; JP2000589143-X

Ostermeier, M., Shim, J. H., y Benkovic, S. J. (1999) A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature Biotechnology* 17:1205-1209

Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M., y Moukha, S. (2000) Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* 267:1619-1625

P

Pagnout, C., Rast, C., Veber, A. M., Poupin, P., y Ferard, J. F. (2006) Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium* sp strain SNP11. *Ecotox. Environ. Safe.* 65:151-158

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., y Sannia, G. (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:920-924

Parekh, R., Forrester, K., y Wittrup, D. (1995) Multicopy Overexpression of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor Saturates the Protein Folding and Secretory Capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification* 6:537-545

Pekkarinen, S. S., Stockmann, H., Schwarz, K., Heinonen, I. M., y Hopia, A. I. (1999) Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 47:3036-3043

Petersen, L. C. y Degn, H. (1978) Steady-State Kinetics of Laccase from *Rhus Vernicifera*. *Biochim. Biophys. Acta* 526:85-92

Petrov, V. V. y Okorokov, L. A. (1990) Increase of the Anion and Proton Permeability of *Saccharomyces-Carlbergensis* Plasmalemma by Normal-Alcohols As A Possible Cause of Its Deenergization. *Yeast* 6:311-318

Pezet, R. y Pont, V. (1992) Differing Biochemical and Histological Studies of 2 Grape Cultivars in the View of Their Respective Susceptibility and Resistance to Botrytis-Cinerea. *Recent Advances in Botrytis Research* 93-98

- Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R., y Vázquez-Duhalt, R. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3805-3809
- Piontek, K., Antorini, M., y Choinowski, T. (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* 277:37663-37669
- Pysh, E. S. y Yang, N. C. (1963) Polarographic Oxidation Potentials of Aromatic Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2124-2128

Q

- Quintanar, L., Yoon, J. J., Aznar, C. P., Palmer, A. E., Andersson, K. K., Britt, R. D., y Solomon, E. I. (2005) Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: Nature of its coordination unsaturation. *J. Am. Chem. Soc.* 127:13832-13845

R

- Ragnar, M., Lindgren, C. T., y Nilvebrant, N.-O. (2000) pKa values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 20:277-305
- Raillard, S., Krebber, A., Chen, Y. C., Ness, J. E., Bermudez, E., Trinidad, R., Fullem, R., Davis, C., Welch, M., Seffernick, J., Wackett, L. P., Stemmer, W. P. C., y Minshull, J. (2001) Novel enzyme activities and functional plasticity revealed by recombining highly homologous enzymes. *Chemistry & Biology* 8:891-898
- Rama, R., Mougin, C., Boyer, F. D., Kollmann, A., Malosse, C., y Sigoillot, J. C. (1998) Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnol. Lett.* 20:1101-1104
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A. M., y Goffner, D. (1999) Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. *Eur. J. Biochem.* 259:485-495
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1231-1237
- Record, E., Punt, P. J., Chamkha, M., Labat, M., van den Hondel, C. A. M. J., y Asther, M. (2002) Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in

- Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 269:602-609
- Reed, G. A. (1987) Co-oxidation of xenobiotics: Lipid peroxy derivatives as mediators of metabolism. *Chem. Phys. Lipids* 44:127-148
- Regalado, V., Rodríguez, A., Perestelo, F., Carnicero, A., de la Fuente, G., y Falcón, M. A. (1997) Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3716-3718
- Riva, S. (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* 24:219-226
- Robles, A., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Ben-Omar, N., Pérez, R., y Gálvez, A. (2002) Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (Syn. *Thielavopsis*) *paradoxa* CH32. *Enzyme Microb. Technol.* 31:516-522
- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A. T., y Martínez, M. J. (2004) Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol. Biochem.* 36:909-916
- Rodríguez, J., Ferraz, A., Nogueira, R. F. P., Ferrer, I., Esposito, E., y Durán, N. (1997) Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 62:233-242
- Romanos, M. A., Scorer, C. A., y Clare, J. J. (1992) Foreign Gene-Expression in Yeast - A Review. *Yeast* 8:423-488
- Rosconi, F., Fraguas, L. F., Martínez-Drets, G., y Castro-Sowinski, S. (2005) Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium mehloti*. *Enzyme Microb. Technol.* 36:800-807
- Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. (1999) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 31:223-236
- Ruiz-Duenas, F. J., Morales, M., Garcia, E., Miki, Y., Martinez, M. J., y Martinez, A. T. (2009) Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Journal of Experimental Botany* 60:441-452

S

- Sagt, C. M. J., Kleizen, B., Verwaal, R., de Jong, M. D. M., Muller, W. H., Smits, A., Visser, C., Boonstra, J., Verkleij, A. J., y Verrips, C. T. (2000) Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4940-4945
- Salazar, O. y Sun, L. (2003) Evaluating a screen and analysis of mutant libraries. Arnold, F. H. and Georgiou, G. Directed enzyme evolution. Screening and selection methods 85-97 Totowa, New Jersey (EEUU), Humana Press
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition New York, Cold Spring Harbor laboratory Press
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001) Molecular cloning. 3rd edition Cold Spring Harbor, New York, CSHL Press
- Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T., y Martínez, M. J. (2001) Transformation of non-phenolic substrates and formation of activated oxygen species by *Coriolopsis rigida* laccase. *Abs. 10th Eur. Congr. Biotechnol.* , Madrid, 8-11 July
- Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T., y Martínez, M. J. (2002) Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white-rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1534-1540
- Scherer, M. y Fischer, R. (2001) Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 199:207-213
- Schoemaker, H. E., Tuor, U., Muheim, A., Schmidt, H. W. H., y Leisola, M. S. A. (1991) White-rot degradation of lignin and xenobiotics. Betts, W. B. Biodegradation: Natural and synthetic materials:157-174 London, Springer-Verlag
- Sepic, E., Bricelj, M., y Leskovsek, H. (2003) Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. *Chemosphere* 52:1125-1133
- Shleev, S., Reimann, C. T., Serezhenkov, V., Burbaev, D., Yaropolov, A. I., Gorton, L., y Ruzgas, T. (2006b) Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase. *Biochimie* 88:1275-1285

- Shleev, S., Reimann, C. T., Serezhenkov, V., Burbaev, D., Yaropolov, A. I., Gorton, L., y Ruzgas, T. (2006a) Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase. *Biochimie* 88:1275-1285
- Shugart, L. R., Jimenez, B. D., y McCarthy, J. F. (1988) Analysis of Adduct Formation in the Bluegill Sunfish Exposed to Benzo(A)Pyrene. *Aquatic Toxicology* 11:413-414
- Shuster, J. R. (1991) Gene expression in yeast: protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* 2:685-690
- Sieber, V., Martínez, C. A., y Arnold, F. H. (2001) Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat. Biotechnol.* 19:456-460
- Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J. L., Levasseur, A., Punt, P. J., vandenHondel, C. A. M. J., Fournel, A., Sigoillot, J. C., y Asther, M. (2004) Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:346-352
- Solis-Oba, M., Ugalde-Saldivar, V. M., Gonzalez, I., y Viniegra-Gonzalez, G. (2005) An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *J. Electroanal. Chem.* 579:59-66
- Srebotnik, E. y Boisson, J. N. (2005) Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 36:785-789
- Steffen, K. T., Hatakka, A., y Hofrichter, M. (2003) Degradation of benzo[a]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: Role of manganese peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3957-3964
- Stemmer, W. P. C. (1994) Rapid Evolution of A Protein In-Vitro by Dna Shuffling. *Nature* 370:389-391
- Stemmer, W. P. C. (2002) Molecular breeding of genes, pathways and genomes by DNA shuffling. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 19:II
- Suominen, K., Kitunen, V., y Smolander, A. (2003) Characteristics of dissolved organic matter and phenolic compounds in forest soils under silver birch (*Betula pendula*), Norway spruce (*Picea abies*) and Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Eur. J. Soil Sci.* 54:287-293

Sutherland, J. B. (1992) Detoxification of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons by Fungi. *Journal of Industrial Microbiology* 9:53-61

T

Tatsumi, K., Wada, S., Ichikawa, H., Liu, S. Y., y Bollag, J. M. (1992) Cross-Coupling of a Chloroaniline and Phenolic Acids Catalyzed by a Fungal Enzyme. *Water Sci. Technol.* 26:2157-2160

Temp, U., Zierold, U., y Eggert, C. (1999) Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Gene* 236:169-177

Terrón, M. C., González, T., Carbajo, J. M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., Dobson, A. D., y González, A. E. (2004) Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genet. Biol.* 41:954-962

Tetsch, L., Bend, J., Janssen, M., y Holker, U. (2005) Evidence for functional laccases in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* and isolation of laccase-specific gene fragments. *FEMS Microbiol. Lett.* 245:161-168

Thurston, C. F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19-26

Tien, M. y Kirk, T. K. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221:661-663

Torres, E., Bustos-Jaimes, I., y Le Borgne, S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Cat. B:Environmental* 46:1-15

Tranchimand, S., Tron, T., Gaudin, C., y Iacazio, G. (2006) Synthesis of bis-lactone lignans through laccase catalysis. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 42:27-31

U

Ullah, M. A., Bedford, C. T., y Evans, C. S. (2000) Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:230-234

Uyama, H. y Kobayashi, S. (2006) Enzymatic synthesis and properties of polymers from polyphenols. *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers* 194:51-67

V

- Vafiadis, A. P. y Bakalbassis, E. G. (2003) A Computational Study of the Structure-Activity Relationships of Some *p*-Hydroxybenzoic Acid Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80:1217-1223
- Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A., y Vázquez-Duhalt, R. (2003) Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* 84:289-299
- van de Laar, T., Visser, C., Holster, M., Lopez, C. G., Kreuning, D., Sierkstra, L., Lindner, N., y Verrips, T. (2007) Increased heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol as sole carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* 96:483-494
- van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H., y Bast, A. (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66:511-517
- Vicuña, R. (1988) Bacterial degradation of lignin. *Enzyme Microb. Technol.* 10:645-655

W

- Williams, G. J., Nelson, A. S., y Berry, A. (2004) Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61:3034-3046
- Williamson, P. R. (1994) Biochemical and Molecular Characterization of the Diphenol Oxidase of *Cryptococcus-Neoformans* - Identification As A Laccase. *J. Bacteriol.* 176:656-664
- Wong, T. S. y Schwaneberg, U. (2003) Protein engineering in bioelectrocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:590-596
- Wong, T. S., Zhurina, D., y Schwaneberg, U. (2006) The diversity challenge in directed protein evolution. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9:271-288

X

- Xiao, B. Q. y Shi, J. (2007) Mechanism of cellulase and laccase in waste paper deinking. *Progress in Environmental Science and Technology, Vol I*:1360-1363
- Xu, F. (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35:7608-7614
- Xu, F. (1997) Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem.* 272:924-928
- Xu, F., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Nelson, B. A., Shuster, J. R., Brown, S. H., Palmer, A. E., y Solomon, E. I. (1998) Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J.* 334:63-70
- Xu, F., Kulys, J. J., Duke, K., Li, K. C., Krikstopaitis, K., Deussen, H.-J. W., Abbate, E., Galinyte, V., y Schneider, P. (2000) Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2052-2056
- Xu, F., Palmer, A. E., Yaver, D. S., Berka, R. M., Gambetta, G. A., Brown, S. H., y Solomon, E. I. (1999) Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase - Axial perturbations of the T1 copper. *J. Biol. Chem.* 274:12372-12375
- Xu, Q., Fu, Y., Qin, M. y Li, Z. (2006) Enzymatic deinking method for waste newspaper. CN1763305-A; CN100365201-C0

Y

- Yamaguchi, H., Maeda, Y., y Sakata, I. (1992) Applications of Phenol Dehydrogenative Polymerization by Laccase to Bonding Among Woody-Fibers. *Mokuzai Gakkaishi* 38:931-937
- Yaropolov, A. I., Skorobogatko, O. V., Vartanov, S. S., y Varfolomeyev, S. D. (1994) Laccase - Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49:257-280
- Yoshida, H. (1883) Chemistry of lacquer (*Urushi*). *J. Chem. Soc.* 43:472-486
- Yoshitake, A., Katayama, Y., Nakamura, M., Iimura, Y., Kawai, S., y Morohoshi, N. (1993) N-linked carbohydrate chains protect laccase-III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 139:179-185

Z

- Zhao, H., Chockalingam, K., y Chen, Z. (2002) Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* 13:104-110
- Zhao, H., Moore, J. C., Volkov, A. A., y Arnold, F. H. (1999) Method for optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Manual of industrial microbiology and biotechnology* :597-604 Washington (EEUU), ASM Press
- Zhao, H. M., Giver, L., Shao, Z. X., Affholter, J. A., y Arnold, F. H. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology* 16:258-261
- Zherdev, A. V., Bizova, N. A., Yaropolov, A. I., Lyubimova, N. V., Morozova, O. V., y Dzantiev, B. B. (1999) Laccase from *Coriolus hirsutus* as alternate label for enzyme immunoassay - Determination of pesticide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 76:203-215
- Zille, A., Ramalho, P., Tzanov, T., Millward, R., Aires, V., Cardoso, M. H., Ramalho, M. T., Gübitz, G. M., y Cavaco-Paulo, A. (2004) Predicting dye biodegradation from redox potentials. *Biotechnol. Progr.* 20:1588-1592
- Zumarraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., Martinez-Arias, A., Plow, F. J., Ballesteros, A., y Alcalde, M. (2007) In vitro evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents. *Chemistry & Biology* 14:1052-1064

8. Anexo

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- Camarero, S., Cañas, A.I., Nousiainen, P., Record, E., Lomascolo, A., Martínez, M.J., y Martínez, A.T. (2008). *p*-Hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environmental Science and Technology* 42, 6703–6709.
- Cañas, A.I., Alcalde, M., Plou, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T., y Camarero, S. (2007). Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environmental Science and Technology* 41:2964-2971.

PATENTES

- Camarero, S., Alcalde, M., Cañas, A.I., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Plou, F. y Ballesteros, A. (Noviembre 2008) Lacasas de alto potencial redox obtenidas por evolución dirigida (P200803322).

